

Veränderungen von
Zwischenstoffkonzentrationen bei der
Grünalge Chlorella
in Abhängigkeit von der Photosynthese

von

INGE LIESENKÖTTER

1961

Veränderungen von Zwischenstoffkonzentrationen
bei der Grünalge Chlorella
in Abhängigkeit von der Photosynthese.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig - Maximilians - Universität
zu München.

vorgelegt
von
Inge Liesenkötter
aus
Berlin

November 1961



Berichterstatter:

Prof.Dr.O.Kandler

Prof.Dr.L.Brauner

Tag der mündlichen Prüfung: 31.Januar 1962

I. Einleitung	1
II. Die Bedeutung der Kunst für die Menschheit	2
1. Die Kunst als Spiegel der menschlichen Seele	3
2. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Vernunft	4
3. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Empfindung	5
4. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Willensfreiheit	6
5. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Liebe	7
6. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Hoffnung	8
7. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Trauer	9
8. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Freude	10
9. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Einsamkeit	11
10. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Gemeinschaft	12
11. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Freiheit	13
12. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Verantwortung	14
13. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Würde	15
14. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Größe	16
15. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Kleinheit	17
16. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Unsterblichkeit	18
17. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Sterblichkeit	19
18. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Unwissenheit	20
19. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Weisheit	21
20. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Gerechtigkeit	22
21. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Ungerechtigkeit	23
22. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Harmonie	24
23. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Disharmonie	25
24. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Einheit	26
25. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Vielheit	27
26. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Ganzheit	28
27. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Unvollständigkeit	29
28. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Vollständigkeit	30
29. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Freiheit	31
30. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Verantwortung	32
31. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Würde	33
32. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Größe	34
33. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Kleinheit	35
34. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Unsterblichkeit	36
35. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Sterblichkeit	37
36. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Unwissenheit	38
37. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Weisheit	39
38. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Gerechtigkeit	40
39. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Ungerechtigkeit	41
40. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Harmonie	42
41. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Disharmonie	43
42. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Einheit	44
43. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Vielheit	45
44. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Ganzheit	46
45. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Unvollständigkeit	47
46. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Vollständigkeit	48
47. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Freiheit	49
48. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Verantwortung	50
49. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Würde	51
50. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Größe	52
51. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Kleinheit	53
52. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Unsterblichkeit	54
53. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Sterblichkeit	55
54. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Unwissenheit	56
55. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Weisheit	57
56. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Gerechtigkeit	58
57. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Ungerechtigkeit	59
58. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Harmonie	60
59. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Disharmonie	61
60. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Einheit	62
61. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Vielheit	63
62. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Ganzheit	64
63. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Unvollständigkeit	65
64. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Vollständigkeit	66
65. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Freiheit	67
66. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Verantwortung	68
67. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Würde	69
68. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Größe	70
69. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Kleinheit	71
70. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Unsterblichkeit	72
71. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Sterblichkeit	73
72. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Unwissenheit	74
73. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Weisheit	75
74. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Gerechtigkeit	76
75. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Ungerechtigkeit	77
76. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Harmonie	78
77. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Disharmonie	79
78. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Einheit	80
79. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Vielheit	81
80. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Ganzheit	82
81. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Unvollständigkeit	83
82. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Vollständigkeit	84
83. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Freiheit	85
84. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Verantwortung	86
85. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Würde	87
86. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Größe	88
87. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Kleinheit	89
88. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Unsterblichkeit	90
89. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Sterblichkeit	91
90. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Unwissenheit	92
91. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Weisheit	93
92. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Gerechtigkeit	94
93. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Ungerechtigkeit	95
94. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Harmonie	96
95. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Disharmonie	97
96. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Einheit	98
97. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Vielheit	99
98. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Ganzheit	100
99. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Unvollständigkeit	101
100. Die Kunst als Ausdruck der menschlichen Vollständigkeit	102

Meinem Großvater, Herrn Prof. Dr. C.Griebel,
zum 86. Geburtstag in großer Dankbarkeit gewidmet.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhalt

	Seite
A. Einleitung	5
B. Methodik	9
I. Material	9
II. Extraktion	9
III. Versuchsanordnung	10
IV. Substratbestimmung im "optischen Test"	11
V. Fermente, Substrate, Lösungen	19
VI. Extraktion und Aufarbeitung der Extrakte bei C ¹⁴ O ₂ -Fixierungen	20
VII. Manometrische Messung von Atmung und Photosyn- these	21
C. Ergebnisse und Diskussion	22
I. Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen bei Zugabe von Glucose zu verarmten Algen im Dunkeln	22
II. Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen beim Dunkel/Licht- und Licht/Dunkel-Übergang (D/L und L/D)	24
a) D/L-Übergang in Luft + CO ₂	24
b) L/D-Übergang in Luft + CO ₂	25
c) D/L- und L/D-Übergang in Luft ohne CO ₂	33
d) L/D-Übergang in Stickstoff ohne bzw. mit CO ₂ ..	37
III. Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen bei unterschiedlicher CO ₂ -Konzentration im Licht ..	39
a) Übergang von Luft + CO ₂ -Begasung zu Luft ohne CO ₂ im Licht (und umgekehrt)	39
b) Übergang von Stickstoff + CO ₂ - Begasung zu Stickstoff ohne CO ₂ im Licht (und umgekehrt) ..	39
Überblick über die Ergebnisse von Teil II und III .	42
IV. Der Einfluß von Monojodessigsäure(MJE) auf die Zwischenstoffkonzentrationen bei Atmung und Photosynthese	48
a) Der Einfluß von MJE auf die Atmung	49
b) Der Einfluß von MJE auf die Photosynthese	53
c) Übergang von Atmung zu Photosynthese unter MJE - Einfluß	53

V.	Der Einfluß von Arsenat auf die Zwischenstoffkonzentrationen bei Atmung und Photosynthese	58
a)	Übergang von Atmung zu Photosynthese nach Vorinkubation mit Arsenat	60
b)	Zugabe von Arsenat während der Photosynthese .	62
VI.	Der Einfluß von 2,4 - Dinitrophenol (DNP) auf die Zwischenstoffkonzentrationen bei Atmung und Photosynthese	65
a)	Übergang von Atmung zu Photosynthese unter DNP - Einfluß	67
b)	Zugabe von DNP während der Photosynthese	71
VII.	Der Einfluß von Cyanid auf die Zwischenstoffkonzentrationen bei Atmung und Photosynthese	73
a)	Der Einfluß von Cyanid auf die Atmung	75
b)	Der Einfluß von Cyanid auf die Photosynthese .	78
c)	Der Einfluß von Cyanid auf die Photosynthese, gemessen an der Verteilung der Radioaktivität nach kurzfristiger $C^{14}O_2$ - Fixierung	82
D.	Schlußbetrachtung	90
E.	Zusammenfassung	93
F.	Literaturverzeichnis	95

A. Einleitung.

Die Lichtenergie, die bei der Photosynthese zum Aufbau von Kohlehydraten aus CO_2 und H_2O verbraucht und somit in organischen Verbindungen gespeichert wird, kann durch den Abbau dieser Substanzen, durch den Atmungsprozeß, stufenweise wieder freigesetzt werden. Dabei wird ein Teil der Energie zur Bildung energiereicher Verbindungen verwendet und so den übrigen Lebensvorgängen in der Zelle zur Verfügung gestellt. Obwohl beide Prozesse, Assimilation und Dissimilation, im Gegensatz zueinander stehen, bestehen enge Beziehungen zwischen ihnen.

Der Abbau der Kohlehydrate durch Glykolyse und Zitronensäurecyklus mit Atmungskettenphosphorylierung ist in allen Einzelheiten bekannt (63) und auch für den Syntheseweg konnte ein sogenannter "Photosynthesecyklus nach Calvin" aufgestellt werden (4,6). In Umkehr der Glykolyse wird demnach die, aus dem carboxylierten Ribulose-1,5-diphosphat (2-carboxy-3-ketopentitol-1,5-diphosphat; 54) entstandene 3-Phosphoglyzerinsäure zu Triosephosphat reduziert und durch die Aldolase zu Fruktosediphosphat kondensiert. Vom Fruktosediphosphat führt einerseits der Weg zu Oligo- und Polysacchariden und andererseits dient es als Substrat der Transaldolase- und Transketolase-Reaktionen zur Regeneration des CO_2 -Akzeptors. Abbildung 1 zeigt eine Übersicht über die wichtigsten Reaktionen und die Verbindung mit der Glykolyse bzw. Atmung.

Nach diesem Schema werden zur Reduktion von einem Mol CO_2 drei Mole ATP benötigt. Versuche von Kandler (37) konnten diese stöchiometrische Beziehung nicht bestätigen. Da außerdem Arbeiten von Kandler und Gibbs (23,35,42), neuerdings auch von Trebst und Fiedler (73), zeigten, daß die Verteilung der Radioaktivität in der gebildeten Hexose nicht spiegelbildlich ist, wie durch Kondensation aus zwei gleichwertigen Triosen zu erwarten war, wurde von Kandler (37) ein anderer Reaktionsweg vorgeschlagen, der durch direkte Reduktion der Ketosäure mit Hilfe des Lichtes, unter Umgehung der Phosphoglyzerinsäure, zum Fruktosediphosphat führt ("PGA-bypass"). Der Zerfall der Ketosäure in 2 Moleküle Phosphoglyzerinsäure würde demnach nur bei ungenügender Reduktionsgeschwindigkeit eintreten. Diese Annahme deckt sich in gewisser Hinsicht mit der Vermutung von Calvin und Massini (12), die vor kurzer Zeit durch Versuche von Bassham und Kirk (7) gestützt wurde, daß die Bildung

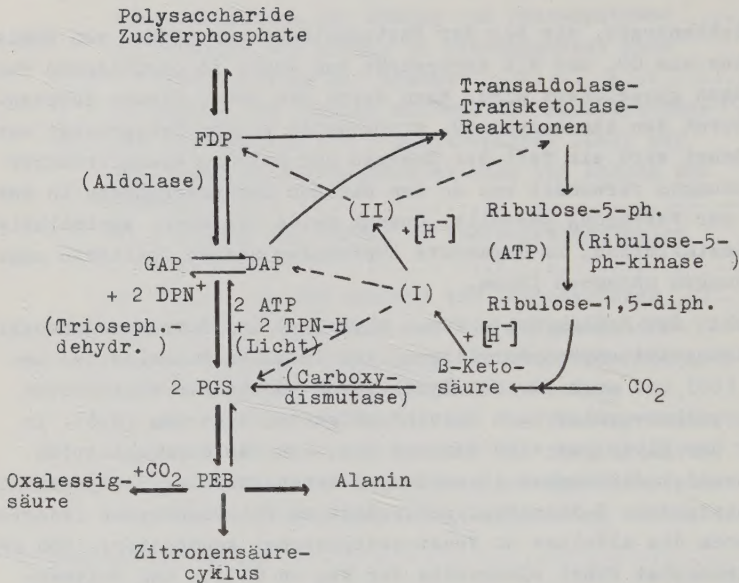


Abbildung 1 : Beziehung zwischen Atmung und Photosynthesezyclus.

————→ = Atmung
————→ = Photosynthese

Abkürzungen s. S. 15.

(I) und (II) = hypothetische Zwischenglieder des
"PGA-by-pass" nach Kandler (44).

von 2 Molekülen Phosphoglyzerinsäure nur nach Ausschalten des Lichtes erfolgt, während im Licht 1 Molekül Phosphoglyzerinsäure und 1 Molekül Triosephosphat entstehen sollen. In diesem Fall wird also eine teilweise Reduktion der Ketosäure im Licht vorausgesetzt.

Auch Arbeiten von Mortimer (53) und Miyachi (52) mit Stoffwechselgiften führten zu Ergebnissen, die nicht mit dem Photosynthesezyklus nach Calvin zu vereinbaren waren. Einen weiteren Angriffspunkt für die Kritik bildeten Untersuchungen über das Vorhandensein und die Aktivität der notwendigen Enzyme. So konnte Richter (61) in der phototrophen Blaualge *Anacystis* keine Aldolase nachweisen, die ja für die Umkehr der Glykolyse unbedingt nötig ist. Fewson und Mitarb. (19), die die Untersuchungen auch auf andere Blaualgen-

gattungen erweiterten, konnten diesen Befund bestätigen.

Außerdem verlangen die Untersuchungen von Racker (58) und Peterkofsky und Racker (56) über Eigenschaften der Carboxydismutase und anderer Enzyme des Pentosecyklus besondere Beachtung. Die geringe Affinität der Carboxydismutase und die sehr niedrige Umsatzzahl dieses Fermentes stehen in keinem Verhältnis zu den hohen Photosyntheseraten bei relativ niedriger CO_2 -Konzentration. Will man trotzdem an der Carboxydismutase als carboxylierendem Ferment festhalten, so muß man in vivo eine Aktivierung des Fermentes annehmen. Calvin und Pon (13) vermuteten eine Beteiligung von Biotin. In Versuchen mit biotinverarmten Ochromonaszellen konnte Kauß (45) jedoch keine Verminderung der Photosyntheseleistung oder anormale Verteilung der Radioaktivität (C^{14}) auf die Zwischenstoffe beobachten.

Für den Nachweis beteiligter Reaktionsfolgen in vivo haben sich vielfach Untersuchungen über Veränderungen von Zwischenstoffkonzentrationen bewährt. Die bisherigen Untersuchungen dieser Art wurden bei der Photosynthese im wesentlichen mit Hilfe der radioaktiven Isotope C^{14} und P^{32} angestellt. Während man mit C^{14} den Weg des Kohlenstoffes verfolgen kann, ermöglicht die Anwendung von P^{32} die Beobachtung der Phosphorylierungsprozesse. Sind alle Verbindungen mit den Isotopen gesättigt, so weisen alle Zwischenstoffe die gleiche spezifische Aktivität auf und Veränderungen der Aktivitätsverteilung sind mit pool-Änderungen gleichzusetzen. Bassham und Mitarb. (5,6) und Bradley (10) untersuchten mit C^{14} bzw. P^{32} die Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen durch Unterbrechung des "steady-state" (Fließgleichgewicht), nach vorheriger Sättigung des Versuchsmaterials mit den entsprechenden Isotopen. Vergleicht man aber die Ergebnisse von Bradley (10) mit P^{32} mit den C^{14} -Versuchen von Bassham und Mitarb. (5,6), so ergibt sich keine gute Übereinstimmung. Da die Inkubationszeit für die entsprechenden Isotope nur 30 min (5) bzw. 60 min (10) betrug, war vermutlich noch keine Sättigung aller Zwischenstoffe erreicht. Man kann also aus den Veränderungen der Aktivitätsverteilung nicht mit Sicherheit auf Verschiebungen der Zwischenstoffkonzentrationen schließen. Aus diesem Grund schien es angebracht, eine direkte Methode zur Bestimmung der Zwischenstoffkonzentrationen anzuwenden.

Dazu eignet sich am besten der sogenannte "optische Test" nach Warburg (77). Die gutausgearbeiteten Bestimmungsmethoden (8,15) haben es bereits möglich gemacht, die verschiedensten Regulationsmechanismen bei der Gärung der Hefe nachzuweisen (20,28), die auf Grund von Phosphatbestimmungen postuliert worden waren (48,49). Der Vorteil dieser Tests liegt einerseits in der relativ schnellen Ausführbarkeit und andererseits in der Möglichkeit, die absolute Konzentration mehrerer Zwischenstoffe einer Reaktionskette gleichzeitig messen zu können. Da durch die Extraktion der gesamte Zellinhalt erfaßt wird, beziehen sich die Messungen nicht nur auf den an einer bestimmten Reaktion beteiligten Anteil einer Substanz, sondern auf die gesamte, zu diesem Zeitpunkt in der Zelle vorhandene Konzentration ("pool") dieses Zwischenstoffes.

Um Rückschlüsse auf die Reihenfolge einer Reaktionskette machen zu können, wird im allgemeinen die Reaktion an einer bestimmten Stelle unterbrochen. Das vor der Blockierung liegende Substrat reichert sich an und bewirkt unter Umständen eine Zunahme seiner Vorläufer, während der "pool" des nachfolgenden Zwischenstoffes "ausläuft". Diese Unterbrechung einer Reaktionskette kann auf verschiedene Weise erfolgen, durch Änderung der Außenfaktoren oder durch Giftzugabe.

Die vorliegende Arbeit soll weitere Argumente zu der Frage beisteuern, ob bei der Photosynthese eine stöchiometrische Beziehung zwischen CO_2 -Fixierung und Phosphoglyzerinsäurebildung besteht, wie sie von Calvin gefordert wird, oder ob ein mehr oder weniger vollständiger "PGA-by-pass" besteht. Abgesehen von der Veränderung von Außenfaktoren (Ein- oder Ausschalten von Licht, verschiedene Gasphasen), wurden verschiedene Hemmstoffe angewandt, die einen möglichst gut bekannten Wirkungsmechanismus haben.

- I. Monojodessigsäure, ein Enzymhemmstoff, der durch Hemmung der Triosephosphatdehydrogenase die Glykolyse und damit nach Calvin auch die Photosynthese hemmt.
- II. Arsenat, das mit Orthophosphat konkurriert und dadurch Phosphorylierungen entkoppelt, oder durch Arsenolyse von Thioestern Reaktionsfolgen unterbricht.
- III. 2,4-Dinitrophenol, ein Gift, das die Phosphorylierung von ADP entkoppelt ohne den Elektronentransport zu hemmen.
- IV. Cyanid, das in schwacher Konzentration das Elektronentransportsystem blockiert und dadurch die oxydative Phosphorylie-

rung hemmt, während es in höheren Konzentrationen außerdem Enzyme hemmt und mit verschiedenen Substraten Verbindungen eingeht.

B. Methodik.

I. Material.

Als Versuchsmaterial diente der gleiche Stamm von *Chlorella pyrenoidosa*, den auch Kandler benutzte (30,37,43). Die Stammkultur wurde auf Schrägagar gehalten und zur Anzucht in 1-Liter-Waschflaschen gebracht. Die Nährlösung enthielt pro 1 l folgende Lösungen: 4 ml KNO_3 (10%), 1 ml $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (10%), 1 ml KH_2PO_4 (10 %), 0,3 ml KCl (10 %), 1 ml MgSO_4 (10 %), 1 ml $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (0,1 %), 5 ml gesättigte Lösung von Trilon (Trilon B, Säureform), 1 ml Hoaglandsche Lösung. Diese Algensuspension wurde mit 4 - 5 % CO_2 in Luft durch perlt und im Abstand von 30 cm zu beiden Seiten durch je zwei Tageslicht-Leuchtstoffröhren (40 Watt) belichtet. In Abständen von 3 - 5 Tagen wurden die Algen durch Zentrifugieren geerntet, zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und in destilliertem Wasser suspendiert. Damit die Algen jeweils zu Versuchsbeginn einen möglichst niedrigen Spiegel an veratembaren Substrat und damit eine konstante Atmung zeigten, erfolgte eine 18- bis 20- stündige Verarmung durch Schütteln der Suspension in einem verdunkelten Erlenmeyerkolben unter Luftzutritt. Nach dem Verarmen wurde erneut zentrifugiert, gewaschen und mit destilliertem Wasser auf das gewünschte Volumen verdünnt. Als Ausgangskonzentration wurde eine 28 %ige Suspension hergestellt (ml nasse, gepackte Zellen /100 ml H_2O) und dann entsprechend auf 14 % bzw. 7 % Endkonzentration verdünnt.

Die Algen wurden unter ständiger mikroskopischer Kontrolle gehalten und sofort aus Stammkulturen neu angesetzt, sobald sich Wachstumsstörungen (Erscheinen von Übergrößen) oder Bakterien zeigten.

II. Extraktion.

Als Extraktionsmittel wird üblicherweise Alkohol, Perchlorsäure oder Trichloressigsäure verwendet.

Da die Bestimmung der Substrate im optischen Test erfolgt, müssen die Extrakte möglichst farblos sein. Eine Extraktion mit Alkohol

kam daher nicht in Frage, da auch nach mehrmaligem Ausschütteln mit Benzin kein farblos-er Extrakt erhalten werden konnte. Außerdem besteht dabei die Gefahr, die Substratmengen nicht quantitativ zu erhalten. Perchlorsäure erschien besonders günstig, da man sie als Kaliumsalz aus dem Extrakt ausfällen kann. Es zeigte sich aber, daß die auf diese Weise gewonnen Extrakte bei den Fermenttesten eine Vorreaktion bewirkten. Die Ursache für die ziemlich umfangreiche Oxydation des DPN-H konnte nicht festgestellt werden.

Es wurde daher Trichloressigsäure (TES) als Extraktionsmittel verwendet. TES hat den Vorteil, besonders schnell in die Zellen einzudringen und daher sekundenschnelles Abtöten zu gewährleisten. Andererseits bewirkt der Trichlorazetatgehalt der Extrakte aber eine Hemmung der für die Tests notwendigen Fermente. Durch entsprechende Zusätze zu den Testlösungen konnten diese Störungen beseitigt werden. (s. S. 14)

Eine 5 - 7 %ige TES-Endkonzentration genügte zur vollständigen Extraktion aller gesuchten Substrate mit Ausnahme von ATP. Eine Wiederholung der Extraktion ergab, daß im 2. Extrakt noch 20 - 30 % und im 3. Extrakt noch ca. 10 % (verglichen mit dem 1. Extrakt) gefunden wurden. Aus diesem Grund wurden sämtliche Proben zweimal extrahiert. Die 2. Extraktion erfolgte mit 5 % TES-Endkonzentration.

Eine merkbare Hydrolyse des ATP durch TES, wie sie von L. Schwink (66) durch Chromatographie beobachtet wurde, konnte mit Hilfe des optischen Testes nicht festgestellt werden. Zugewetztes ATP wurde nach der Extraktion quantitativ wiedergefunden.

III. Versuchsanordnung.

Die Versuche wurden mit einem sogenannten "Lollipop" (12) ausgeführt (Abbildung 2). Es ist dies eine von einem Kühlmantel umgebene Glasküvette mit drei Öffnungen. (Durchmesser: ca. 6,5 cm; Volumen: 45 ml). Durch die obere Öffnung wird die Algensuspension eingefüllt, außerdem führt durch diese Öffnung ein Glasstab, der, mit einem Schliff versehen, die untere Öffnung der Küvette verschließt. Durch Hochziehen des Glasstabes können so in Abständen von wenigen Sekunden Proben entnommen werden. Durch die seitliche Öffnung führt eine Kanüle, die zum Einleiten von Gas oder Einspritzen von Giften und dergl. dient. Zwei Glasscheiben im Kühlmantel,

zu beiden Seiten der Kuvette, ermöglichen eine Belichtung der Suspension. Zur Belichtung wurden zu beiden Seiten in einer Entfernung von 20 oder 30 cm eine Lampe angebracht (Nitraxphot BR 500 W).

Zu Beginn jedes Versuches wurde die Algensuspension im Lollipop 10 oder 15 min unter den Ausgangsbedingungen gehalten, daraufhin eine Probe entnommen und dann nach der entsprechenden Änderung der Bedingungen (Giftzugabe, Einschalten des Lichtes etc.), in den gewünschten Zeitabständen weitere Proben entnommen. Bei längeren Zeitintervallen wurden die Proben (6 - 7 ml) in graduieren Zentrifugengläsern aufgefangen, die 50 %ige TES enthielten (5 - 7 % Endkonzentration) und sofort umgeschüttelt. Betrug die Zeitabstände nur wenige Sekunden, so wurden die Proben in Glasschälchen mit TES aufgefangen, um ein noch schnelleres, gleichmäßiges Abtöten zu erreichen.

Nach dem Zentrifugieren der Proben wurde der Rückstand nochmals extrahiert, zentrifugiert, die vereinigten Extrakte mit Kalilauge auf pH 5 - pH 6 gebracht und bis zur Messung im Kühlschrank aufbewahrt.

Für die langfristigen Monojodessigsäureversuche wurde eine andere Apparatur benutzt. Die Algensuspension wurde gleichmäßig auf eine Anzahl von Glasgefäßen verteilt (Abbildung 3), die an einem eisernen Ring anmontiert, in einem Wasserbad von konstanter Temperatur (20° C) geschüttelt wurden. Die Belichtung erfolgte durch 3 Lampen (Attralux 300 W), die unterhalb des Wasserbades, ca. 40 cm von den Gefäßen entfernt, angebracht waren. Das Abtöten erfolgte durch Einspritzen von TES durch den seitlichen Tubus, die weitere Aufarbeitung in der gleichen Weise wie oben beschrieben.

IV. Substratbestimmungen im "optischen Test".

Die Bestimmung aller Substrate erfolgte im "optischen Test" nach Warburg (77).

Mit diesen Testen lassen sich alle Substrate messen, die durch die Gärungsfermente mit einer Wasserstoffübertragung in Verbindung gebracht werden können, an der DPN bzw. DPN-H beteiligt ist. DPN-H hat im Gegensatz zu DPN bei 340 m μ ein ausgeprägtes Lichtabsorptionsmaximum. Wird DPN-H im Laufe einer Fermentreaktion de-

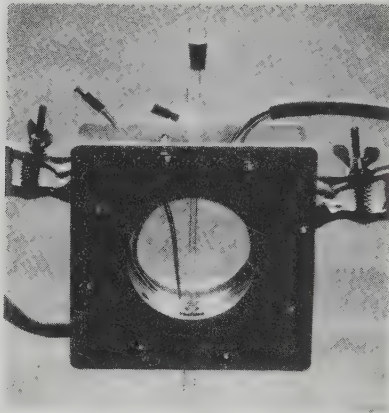


Abbildung 2: "Lollipop"



Abbildung 3: Photosynthesegefäß (17)

hydriert, so kann man eine Abnahme der Extinktion beobachten. Werden für die Reaktionen reine Fermentpräparate verwendet und sind alle Reaktionspartner im Überschuß vorhanden, so kommt die Reaktion zum Stillstand, sobald das zu testende Substrat verbraucht ist. Die Extinktionsabnahme, also der Verbrauch an DPN-H entspricht dann stöchiometrisch dem Umsatz an Substrat.

Auswertung (8).

Bei einer Dichte von $d = 4$ cm und einem Volumen von $v = 6$ ml, entspricht eine Extinktionsänderung von $0,1$ E einem Umsatz von $28,84$ DPN-H.

(Molarer Extinktionskoeffizient, d. h. 1 Mol/ 1 ml bei $d = 1$ cm:

$$\Delta_{\text{E DPN}}_{366 \text{ m}\mu} = 3,33 \cdot 10^6$$

Aus der Gleichung: $0,1 \text{ E} = \frac{\text{MG-Substrat} \cdot 28,84}{\text{MG-DPN-H}}$ ergibt sich die

Menge Substrat ($\text{in } \mu$), die einer Extinktionsänderung von $0,1$ E entspricht. (MG = Molekulargewicht)

Da für die verschiedenen Tests verschiedene Mengen an Extrakt eingesetzt wurden und außerdem die Konzentration der Algensuspension bei den verschiedenen Versuchen und auch innerhalb mancher Versuche (z. B. durch Giftinjektion) unterschiedlich war, läßt sich kein allgemeiner Umrechnungsfaktor angeben. Die Extinktion wurde jeweils auf das Gesamtvolumen einer Probe berechnet und die Molarität auf 1 ml nasse Algenmasse (sedimentiert durch Zentrifugieren) bezogen. Dabei entsprachen 1 ml Algenmasse einem Trockengewicht von 150 mg und einem Chlorophyllgehalt von $6,2$ mg. Zur Berechnung des Chlorophyllgehaltes wurde eine entsprechende Menge der Algensuspension mit Methanol auf 25 ml aufgefüllt, nach leichtem Erwärmen filtriert und die Extinktion bei 645 bzw. $663 \text{ m}\mu$ gemessen. Aus der Gleichung:

$\mu\text{-Chlorophyll} = (E_{645} \cdot 20,2 + E_{663} \cdot 8,02) 25 \text{ ml}$ errechnet sich der Chlorophyllgehalt (1).

Die Meßgenauigkeit betrug $0,005$ E. Das entsprach bei dem Extrakt einer 14 %igen Algensuspension $0,04 \mu\text{Mol}$ PGS (bei $0,5$ ml eingesetztem Extrakt); $0,02 \mu\text{Mol}$ ATP bzw. ADP (bei 1 ml eingesetztem Extrakt); $0,01 \mu\text{Mol}$ BTS, PEB, DAP (bei 2 ml eingesetztem Extrakt) und $0,005 \mu\text{Mol}$ FDP (bei 2 ml Extrakt).

Die aus der Absorptionsänderung errechneten Werte für die Zwischenstoffkonzentrationen wurden in ein Koordinatensystem eingetragen. Die in der vorliegenden Arbeit abgebildeten Kurvendiagramme stellen jeweils einen besonders typischen von drei oder vier gleichartigen Versuchen dar.

Ausführung des "optischen Testes".

Die Extinktionsmessungen wurden am Photometer "Eppendorf" bei 366 m/ μ und Zimmertemperatur durchgeführt. Die zu dem Test nötigen Lösungen wurden in eine Küvette ($d = 4$ cm) einpipettiert, mit einem dünnen Glasstab vermischt und die Extinktion abgelesen. (Die Fermentlösungen wurden während der Meßzeit unter Eiskühlung gehalten.) Bei den Testen für Phosphoglyzerinsäure bzw. Adenosintriphosphat und Fructose-1,6-diphosphat bzw. Dihydroxyacetonphosphat stellte sich ein gewisser Gang ein. DPN-H wurde in geringen Mengen bereits vor Fermentzugabe oxydiert (eventuell durch die Anwesenheit von Cystein katalysiert). Dieser Gang betrug höchstens 0,0025 E/min und blieb gleichmäßig. Durch die nun erfolgende Zugabe von Ferment wurde die Reaktion gestartet und der neue Extinktionswert abgelesen, sobald sich der anfangs beobachtete Gang wieder eingestellt hatte. Im zusammengesetzten Test folgt nun die Zugabe des zweiten Fermentes. Die Eigenextinktion des Fermentes muß bei der Ablesung berücksichtigt werden. Die Testbedingungen wurden so gewählt, daß die Reaktionen spätestens nach 5 bis 15 min abgelaufen waren. Die Bestimmung der Phosphoglyzerinsäure dagegen dauerte zuweilen bis zu 30 min. Für alle Tests wurden Eichkurven mit authentischem Substrat aufgestellt, um die Proportionalität zu prüfen.

Außerdem wurde durch Parallelproben die Reproduzierbarkeit der Messungen geprüft und bestätigt.

Zur Kontrolle auf den Überschuß an Ferment und Cofaktoren wurde nach Beendigung eines Testes jeweils eine bekannte Menge an Substrat zugegeben und der erneute Anlauf der Reaktion beobachtet.

Störungen.

Die Hemmung, die das in den Extrakten enthaltene Trichlorazetat bei verschiedenen Fermenten bewirkt, konnte durch Zugabe von Glykokoll, Trilon und Cystein aufgehoben werden. Der entsprechen-

de Test lief zwar langsamer als ohne Trichlorazetat, aber vollständig.

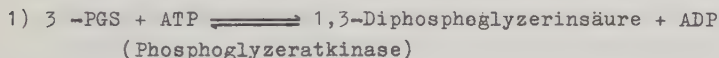
Lediglich zur Bestimmung von Glucose-6-phosphat mit dem Zwischenferment (Glucose-6-phosphatdehydrogenase) mußte die TES vorher entfernt werden. Zu diesem Zweck wurden einige ml des Extraktes mit konzentrierter Schwefelsäure unter Eiskühlung angesäuert, sodaß eine Endkonzentration von 1 n H_2SO_4 erreicht wurde und der Extrakt daraufhin dreimal mit der jeweils dreifachen Menge Äther je 2 min lang geschüttelt. Der ausgeätherte Extrakt wurde 30 min an der Wasserstrahlpumpe belüftet, mit Kalilauge neutralisiert und dann auf Glucose-6-phosphat getestet. In dem auf diese Weise erhaltenen Extrakt konnte Glucose-6-phosphat quantitativ bestimmt werden. Allerdings war es auch dann noch nicht möglich, in beleuchteten Algenextrakten Glucose-6-phosphat nachzuweisen. Die Ursache dafür konnte nicht gefunden werden.

Testzusammensetzung. (43)^{xx}

Anhaltspunkte für die Testzusammensetzung wurden den "Methods in Enzymology" (15) und der Dissertation von Freytag (20) entnommen. Die Teste wurden entsprechend abgeändert bzw. erweitert.

a) Phosphoglyzerinsäuretest.

Die Hauptreaktion verläuft nach der Gleichung:



^{xx}) Es werden folgende Abkürzungen verwendet:

ADP = Adenosindiphosphat
ATP = Adosintriphosphat
BTS = Brenztraubensäure
DAP = Dihydroxyacetonphosphat
DPN-H = Diphosphopyridinnukleotid
(red.)

FDP = Fructose-1,6-diphosphat
GAP = Glyzerinaldehydphosphat
G-6-P = Glucose-6-phosphat
GSH = Glutathion (red.)
PGS = Phosphoglyzerinsäure

PEB = Phosphoenolbrenztraubensäure
RuDP = Ribulosediphosphat
TPN = Triphosphapyridinnukleotid
Trilon = Diaminoäthylentetraazetat

Trappuffer = Triäthanolamin (mit HCl auf pH 7,6 eingestellt)
Trispuffer = Trisoxymethylaminomethan (mit HCl auf pH 8 eingestellt)

2) Hilfsreaktion: (Glyzerinaldehydphosphatdehydrase)



Testzusammensetzung:

0,15 ml DPN-H (372 μ); 0,6 ml 0,02 m ATP; 0,3 ml 0,1 m Hydrazinsulfat; 0,1 ml 1,2 m Cystein $\cdot$ HCl; 0,14 ml 1 n KOH (zur Neutralisation von Hydrazinsulfat und Cystein); 0,12 ml 0,5 m MgSO₄; 0,6 ml 1 m Glykokoll; 0,5 ml neutralisierter Algenextrakt; 3,19 ml 0,2 m Trappuffer, pH 7,6.

Start der Hilfsreaktion mit 0,2 ml (100 μ) Glyzerinaldehydphosphatdehydrogenase, danach Start der Hauptreaktion mit 0,1 ml (50 μ) Phosphoglyzeratkinase.

d = 4 cm; v = 6 ml; pH = 7,6.

Hydrazinsulfat dient dazu, den entstehenden Phosphoglyzerinaldehyd abzufangen. Die Reaktion verläuft trotzdem noch sehr langsam und es wurde daher durch Phosphatbestimmungen geprüft, ob der Test quantitativ verläuft. Die Phosphatbestimmung erfolgte nach den "Arbeitsvorschriften für das Photometer Eppendorf". Von einer PGS-Lösung wurde eine Probe verascht, als Phosphatgehalt ergaben sich 31 μ PO₄'''. Die gleiche Menge der gleichen PGS-Lösung wurde im optischen Test bestimmt und das Ergebnis auf PO₄''' berechnet; es ergaben sich 29,8 μ Phosphat.

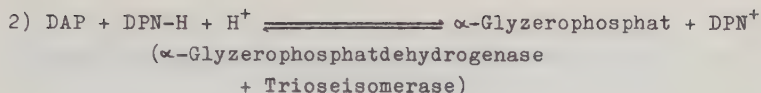
Es muß noch erwähnt werden, daß die in den Extrakten gemessene PGS nicht nur der in der Zelle ursprünglich vorhandenen 3-PGS entspricht. Durch die Extraktion wird die vorhandene 1,3-Diphosphoglyzerinsäure zu 3-PGS gespalten. Ebenso zerfällt das Carboxylierungsprodukt des RuDP, die hypothetische β -Ketosäure, in 3-PGS.

b) Adenosintriphosphat-Test.

Die Bestimmung verläuft nach der gleichen Reaktion und Testzusammensetzung wie Test a). Anstelle von 0,6 ml 0,02 m ATP werden 0,6 ml 0,1 m PGS zugegeben, außerdem 1 ml Algenextrakt und entsprechend nur 2,19 ml Trappuffer.

c) Fructose-1,6-diphosphat- und Triosephosphat-Test.





Testzusammensetzung:

0,15 ml DPN-H (372 μ); 0,12 ml Trilon (1 %, neutral); 0,3 ml
0,27 m Glykokoll; 0,6 ml 0,1 m Cystein · HCl; 0,1 ml 1 n KOH;
2 ml neutralisierter Algenextrakt; 2,43 ml 0,2 m Trappuffer.

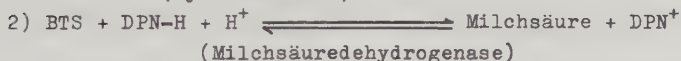
Start von Reaktion 2) mit 0,2 ml (100 μ) einer Mischung von
 α -Glyzerophosphatdehydrogenase und Trioseisomerase. Nach Be-
endigung dieser Reaktion Start mit 0,1 ml (50 μ) Aldolase.

d = 4 cm; v = 6 ml; pH = 7,6.

Durch die Gegenwart von Trioseisomerase wird auch der entstehende
Phosphoglyzerinaldehyd als Dihydroxyacetonphosphat gemessen; es
ergibt sich also bei der Reaktion 2) die Summe der Triosen.

Für die Berechnung von FDP ist daher zu beachten, daß dem Umsatz
von 1 Mol FDP der Umsatz von 2 Mol DPN-H entspricht.

d) Brenztraubensäure-Phosphoenolbrenztraubensäure-Test.



Testzusammensetzung:

0,15 ml DPN-H (372 μ); 0,2 ml 0,02 m ADP; 0,15 ml 2 m KCl;
0,1 ml 0,5 m MgSO_4 ; 0,16 ml Trilon (1 %ig, neutral); 2 ml
neutralisierter Extrakt; 3,04 ml 0,2 m Trappuffer.

Start von Reaktion 2) mit 0,1 ml (50 μ) Milchsäuredehydro-
genase zur Bestimmung der vorhandenen BTS. Danach Start mit
0,1 ml (50 μ) Pyruvatkinase zur Bestimmung der PEB als BTS.

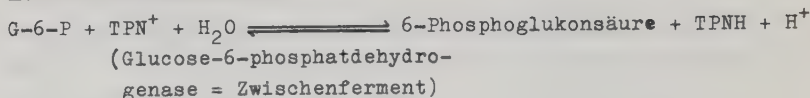
d = 4 cm; v = 6 ml; pH = 7,6.

e) Adenosindiphosphat-Test.

Die Bestimmung erfolgt nach der gleichen Reaktion und Test-
zusammensetzung wie bei Test d). Anstelle von 0,2 ml 0,02 m
ADP erfolgt Zugabe von 0,2 ml 0,0125 m PEB. Der Zugabe von
1 ml Algenextrakt entsprechen 4,04 ml 0,2 m Trappuffer.

Durch die Hilfsreaktion wird die im Algenextrakt und im PEB-Präparat enthaltene BTS reduziert.

f) Glucose-6-Phosphat-Test. (60)



Testzusammensetzung:

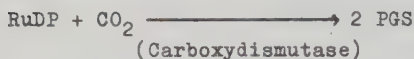
0,2 ml 0,002 m TPN (pH 6,8); 2 ml 0,19 m Trispuffer pH 8;
0,2 ml 0,3 m MgSO_4 ; 1 ml neutralisierter, Trichlorazetat-
freier Algenextrakt; 2,5 ml H_2O .

Die Reaktion wird mit 0,1 ml (10_r) Zwischenferment gestartet.

d = 4 cm; v = 6 ml; pH = 8.

g) Ribulosediphosphat-Test. (80)

Der Test beruht auf der Carboxylierung und Spaltung von RuDP in Phosphoglyzerinsäure durch die Carboxydismutase.



Testzusammensetzung:

1 ml neutralisierter Algenextrakt; 0,1 ml NaHCO_3 (75 μM);
0,1 ml MgCl_2 (15 μM); 0,05 ml GDH (9 μM); 0,05 ml Trilon
(0,09 μM); 0,22 ml H_2O , pH 8.

Diese Lösung wird 3 min lang mit 5 % CO_2 in Stickstoff gesättigt und dann mit 0,2 ml Carboxydismutase (4 Einheiten) 30 min lang bei 25° C inkubiert. Eine Einheit ist definiert als die Menge an Ferment, die in 10 min 1 μM PGS bildet (80). Die Reaktion wird gestoppt durch Zugabe von 0,095 ml 1 n HCl und 1 min erhitzen im kochenden Wasserbad.

In einem Teil der Lösung wird die entstandene PGS nach Test a) bestimmt. Die im Extrakt bereits vorher enthaltene PGS muß davon abgezogen werden.

V. Fermente, Substrate und Lösungen.

Alle Fermente und Substrate (außer Carboxydismutase und Ribulosediphosphat) wurden von der Firma Boehringer & Sohn bezogen. Die Fermente wurden mit dem entsprechenden Puffer verdünnt. Die Lösung von Glycerinaldehyddiphosphatdehydrase wurde außerdem mit Trilon versetzt und dadurch eine wesentlich bessere Haltbarkeit erreicht. (Verhältnis: 0,1 ml Fermentsuspension = 1 mg krist. Ferment, 0,7 ml 0,2 m Trappuffer, 1,2 ml Trilon).

Die Herstellung der Lösungen und die Präparation von PGS und PEB erfolgte nach Freytag (20). Alle Lösungen wurden mit quarzredestilliertem Wasser angesetzt.

Darstellung von Ribulosediphosphat (Natrium-Salz).

Ribulosediphosphat wurde nach Trebst (51) durch cyclische Photophosphorylierung dargestellt.

Die Darstellung wurde in der für die Monojodessigsäure-Versuche beschriebenen Apparatur vorgenommen. Jedes Gefäß enthielt: 0,4 ml 0,2 m Trispuffer, pH 8; 0,1 ml $MgCl_2$ ($5/\mu M$); 0,1 ml GSH ($10/\mu M$); 0,2 ml Na_3PO_4 ($40/\mu M$); 0,1 ml ADP ($0,5/\mu M$); 0,1 ml Vit. K_5 ($0,5/\mu M$); 1 ml Chloroplastenextrakt; 0,5 ml gebrochene Chloroplasten.

(Chloroplastenextrakt und gebrochene Chloroplasten waren äquivalent 2 mg Chlorophyll/ml.)

Die Gefäße wurden mit Stickstoff durchspült und dann pro Gefäß 0,3 ml Ribulose-5-phosphat zugegeben. Nach einstündiger Belichtung wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,2 ml 20 % TES gestoppt. Nach dem Abzentrifugieren wurde der Extrakt auf pH 6 eingestellt, pro Gefäß $60/\mu M$ ol Bariumazetat und das gleiche Volumen an Äthanol zugegeben. Die Niederschlag wurde mit 80 %igem Äthanol gewaschen und durch Gefriertrocknung vom Alkohol befreit.

Der auf diese Weise erhaltene Niederschlag an Ba-Verbindungen wurde mit Hilfe eines sauren Kationenaustauschers in Lösung gebracht und mit Natronlauge neutralisiert.

Darstellung der Carboxydismutase.

Carboxydismutase wurde nach Weissbach und Mitarb. (80) aus Spinat dargestellt.

Die Anreicherung wurde nur bis zur "Ammoniumsulfat II"-Fraktion vorgenommen. Die Aufbewahrung erfolgte bei -16°C . Das so erhaltene Ferment wurde mit RuDP getestet (Test g).

Kontrollen:

Es ergab sich Proportionalität für verschiedene Fermentkonzentrationen bei Überschuß an RuDP. Ebenso ergab sich Proportionalität bei Überschuß an Ferment (2 - 8 Einheiten) und begrenzender Menge an RuDP.

20 min Inkubationszeit bei 25°C ergaben das gleiche Resultat wie 30 min.

Bei Gegenwart von Trichlorazetat wurde die Test-Reaktion stark gehemmt (ca. 50 %). Diese Hemmung konnte durch Verlängerung der Reaktionszeit oder Fermentüberschuß nicht behoben werden. Es wurde versucht, die Hemmung durch Ausäthern der Trichloressigsäure (s. S. 15) zu beseitigen. Im ausgeätherten Extrakt konnte aber vorher zugesetztes RuDP nicht nachgewiesen werden (eventuell auf Grund der hohen Konzentration an K_2SO_4). Da trotz der Hemmung die Proportionalität, unter den angegebenen Testbedingungen (s. S. 15) bis zu $0,8\text{ }\mu\text{M}$ RuDP erhalten blieb, wurde auf weitere Untersuchungen zur Beseitigung der Hemmung verzichtet.

Zugabe von $\text{NaHCO}_3^{14}\text{O}_2$ zum Test, Chromatographie, Dephosphorylierung und Co-Chromatographie zeigten, daß es sich bei dem radioaktiven Reaktionsprodukt ausschließlich um PGS handelte.

VI. Extraktion und Aufarbeitung der Extrakte bei C^{14}O_2 -Fixierungen(4)

Die Versuche wurden im gleichen Lollipop durchgeführt und die einzelnen Proben durch kalten Alkohol abgetötet (80 % Endkonzentration). Von jeder Probe wurden 0,05 ml auf Plättchen aufgetragen, gezählt und die Gesamtfixierung berechnet. Nach dem Abzentrifugieren wurde der Rückstand je einmal mit 96 %igem Alkohol und 20 %igem Alkohol (unter leichtem Erwärmen) nochmals extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden eingeengt, ein Teil davon zweidimensional und der Rest eindimensional auf Chromatographiebögen (Whatman Nr. 1) aufgetragen. Als Lösungsmittel für die 1-d-Chromatogramme wurde ein Butanol-Propionsäure-Wasser-Gemisch genommen, während die 2-d-Chromatogramme erst in wassergesättigtes Phenol und dann in Butanol-Propionsäure gehängt wurden.

Nach dem Trocknen wurden die Chromatogramme auf Röntgenfilm gelegt, nach entsprechenden Zeitabständen die Filme entwickelt, und die Radioaktivität der durch markierte Verbindungen entstandenen Flecke auf den dazugehörigen Chromatogrammen mit einem Großflächenzählrohr gemessen. Die radioaktiven Phosphatester wurden mit Polydase^{de} phosphoryliert und nochmals zweidimensional chromatographiert.

VII. Manometrische Messung von Atmung und Photosynthese nach Warburg. (74)

Zur Atmungsmessung wurde die Algensuspension mit oder ohne Glucose in den Hauptraum der Atmungsströge gegeben. Der Einsatz der Gefäße enthielt 0,3 ml 5 %ige Kalilauge und Filtrierpapier zur Vergrößerung der Oberfläche. Durch die Kalilauge wird das bei der Atmung gebildete CO_2 absorbiert, sodaß der O_2 -Verbrauch manometrisch gemessen werden kann. Für Atmungsmessungen bei Gegenwart von Giften wurde die entsprechende Menge Gift in die seitlich angeschmolzene Birne gegeben. Zu Beginn der Messung wurden die Gefäße einige Minuten lang im Wasserbad ($T = 22^\circ \text{C}$) geschüttelt, daraufhin die Verbindung mit der Außenatmosphäre unterbrochen und in entsprechenden Zeitabständen der O_2 -Verbrauch abgelesen. War eine konstante Leer- bzw. Glucose-Atmung erreicht, so wurde bei den Giftversuchen zu den entsprechenden Proben Gift durch Kippen der Gefäße zugegeben. Weiteres Ablesen des O_2 -Verbrauches zeigte dann den Einfluß des Giftes auf die Atmung.

Zur Photosynthesemessung wurden die Algen in einem Bicarbonatpuffer ($\text{pH} \approx 8,6$; Endkonzentration $\text{m}/10$) suspendiert. Durch den Puffer wird ein konstanter CO_2 -Druck im Gefäß gewährleistet, sodaß der gebildete Sauerstoff unabhängig von dem CO_2 -Verbrauch manometrisch gemessen werden kann. Die Belichtung erfolgte durch eine Xenon Hochdrucklampe (36).

C. Ergebnisse und Diskussion.

I. Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen bei Zugabe von Glukose zu verarmten Algen im Dunkeln. (Abbildung 4)

In der Einleitung wurde bereits erwähnt, daß durch die Bestimmung von Zwischenstoffkonzentrationen verschiedene Regulationsmechanismen bei der Gärung und Atmung der Hefe nachgewiesen werden konnten. Die Zunahme der BTS-, Triose- und FDP-Konzentration, die Freytag (20) nach Zugabe von Glukose zu atmender Hefe beobachtete, konnte durch Mangel an oxydiertem DPN^+ erklärt werden. Da durch die Atmung primär genügend DPN^+ vorlag, konnte BTS in großen Mengen gebildet werden. Der BTS-Spiegel sinkt jedoch sehr schnell wieder und stattdessen reichert sich DAP und FDP an, was auf Mangel an DPN^+ an der Stufe der Triosephosphatdehydrogenase und auf Mangel an anorganischem Phosphat, das durch die Atmungskettenphosphorylierung in erhöhtem Maße verbraucht wurde, zurückzuführen war.

Um eine erste Vorstellung davon zu bekommen, ob auch bei Chlorella meßbare Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen beobachtet werden können, wurden, analog zu den Versuchen von Freytag, die Induktionserscheinungen untersucht, die in den ersten Sekunden nach Glukosezugabe zu verarmten Algen auftreten. In Abbildung 4 ist das Ergebnis eines solchen Versuches dargestellt. Die Konzentrationsveränderungen sind im Vergleich zu den Versuchen mit Hefe wesentlich geringer. Außerdem zeigt sich ein deutlicher Unterschied. Während der BTS-Anstieg die auffälligste Induktionserscheinung bei der Glukose veratmenden Hefe darstellt, zeigt sich bei Chlorella eine starke PGS-Anreicherung (PGS wurde leider von Freytag nicht gemessen) und eine Zunahme der Triosen. Die BTS-Konzentration bleibt dagegen niedrig und nur die PEB nimmt langsam zu.

Während bei der Hefe die oxydative Decarboxylierung der BTS die begrenzende Reaktion ist, entsteht bei der Glukoseatmung von Chlorella offenbar an der Stufe der PEB ein Engpaß durch Mangel an Phosphatakzeptor, der ja in erhöhtem Maß für die Atmungskettenphosphorylierung benötigt wird. Gegen diese Erklärungsweise der Steuerung spricht allerdings die Tatsache, daß durch die Hexokinase-Reaktion ADP geliefert wird, denn ähnlich wie bei den Versu-

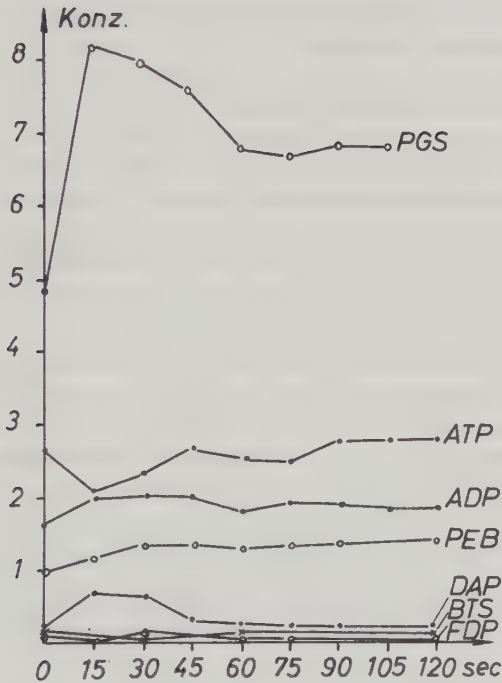


Abbildung 4: Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen durch Zugabe von Glukose zu einer verarmten Algensuspension im Dunkeln. Gasphase: Luft; 1 % Glukose; PGS additiv um $4 \cdot 10^{-4} \text{m}$ vermindert. Konzentration $\cdot 10^{-4} \text{m}$.

chen von Freytag zeigt sich eine Abnahme an ATP und geringe Zunahme an ADP.

Das Ergebnis dieser Versuche ermutigte dazu, nun auch die Zwischenstoffkonzentrationen in Abhängigkeit von der Photosynthese zu untersuchen, da bisher auf diesem Gebiet nur Phosphat als "Zwischenstoff" direkt bestimmt wurde. (30,78)

II. Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen beim Dunkel/Licht- und Licht/Dunkel-Übergang.

Für die Erforschung des Photosynthesecyklus waren die Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen beim Übergang von Dunkel in Licht bzw. umgekehrt, von ausschlaggebender Bedeutung (5,6,9,10), denn Geschwindigkeit und Ausmaß der Konzentrationsänderungen während der ersten Sekunden nach Unterbrechung des stationären Fließgleichgewichtes lassen auf die mehr oder weniger starke Beteiligung der verschiedenen Stoffe an den Photosynthesereaktionen und auf ihre gegenseitigen Beziehungen schließen.

So beobachteten Bassham und Mitarb. (5), unter Anwendung von C^{14} , beim Ausschalten des Lichtes eine sofortige Abnahme von RuDP und eine gleichzeitige Zunahme der Radioaktivität in PGS. Auf Grund des Photosyntheschemas nach Calvin war anzunehmen, daß das plötzliche Ausschalten des Lichtes zu einer Unterbrechung der Reduktion und damit zu einem Anstieg der PGS führen muß. Die Geschwindigkeit des PGS-Anstieges entspräche dann in den ersten Sekunden der normalen Bildungsgeschwindigkeit während der Photosynthese, und erst die Abnahme des RuDP-pools würde eine Verlangsamung herbeiführen.

Aus dem Vergleich zwischen PGS-Anstieg und RuDP-Abfall in den ersten Sekunden nach Verdunklung errechneten Bassham und Mitarb. ein Verhältnis von 1 : 2. Es wurde darin zum ersten Mal ein Beweis dafür gesehen, daß auch in vivo aus einem Molekül RuDP, nach Anlagerung von einem Molekül CO_2 , zwei Moleküle PGS gebildet werden. Die bereits erwähnten Versuche von Bradley (10) ließen jedoch keine derartigen Zusammenhänge erkennen. Daher wurden mit Hilfe des "optischen Testes" die absoluten Konzentrationsänderungen beim Ein- bzw. Ausschalten des Lichtes untersucht.

a) Dunkel/Licht-Übergang in Luft + CO_2 .

Um die Lichtsättigung zu überprüfen, wurden Parallelversuche mit Suspensionen verschiedener Dichte gemacht. Die Algensuspensionen wurde jeweils 15 min lang im verdunkelten Lollipop von einem Gasgemisch aus 99,5 % Luft und 0,5 % CO_2 durchspült. Nach Entnahme der Ausgangsprobe wurde Licht eingeschaltet und die Verdunklung entfernt. Während bei 28 %iger Suspension (Abbildung 5a) die Konzentrationsänderungen nur langsam erfolgen, ist der Unterschied

zwischen 14 %iger und 7 %iger Suspension nur sehr gering (Abbildung 5b, 5c). Aus diesem Grund wurden für die weiteren Versuche 14 %ige Algensuspensionen verwendet, da die Zwischenstoffe in den Extrakten einer 14 %igen Suspension noch in genügend hoher Konzentration vorliegen, während die Konzentrationen in 7 %iger Suspension (abgesehen von PGS) zu niedrig sind, um im "optischen Test" gute Extinktionsänderungen zu bewirken. Man müßte in diesem Fall mehr als 2 ml Extrakt zusetzen, was durch die hohe Trichlorazetatkonzentration zu verstärkter Hemmung der Fermente führt.

Entsprechend den Ergebnissen von Bassham und Calvin (6) sinkt der PGS-Spiegel, nach Einschalten des Lichtes (Abbildung 5b), während der ersten 30 sec um fast 50 %. Ebenso zeigt sich auch eine Abnahme der PEB um 60 % nach einer Minute. Im Gegensatz dazu nehmen die Triosen (DAP) nach 30 sec um das 4- bis 5-fache und die FDP sogar um das 15-fache des Ausgangswertes zu.

Wie aus Abbildung 6 ersichtlich, steigen der PGS- und PEB-Spiegel im Laufe der folgenden Minuten wieder an. Auch die Kontrollproben der Giftversuche (Abbildung 21, 26, 30) zeigen, daß die PGS nach längerer Belichtung wieder die gleiche Konzentration wie im Dunkeln erreicht. Die BTS-Konzentration ändert sich in den ersten Minuten praktisch überhaupt nicht, aber nach 30 min beträgt sie, in gleicher Weise wie die Konzentration des FDP und der Triosen, das 3-fache des Ausgangswertes.

Der ATP-Spiegel steigt nach Einschalten des Lichtes an und erreicht nach 30 sec ein Maximum. Dieses Maximum entspricht dem von Kandler (30) gefundenen Minimum an anorganischem Phosphat nach 30 sec. Gleichzeitig erfolgt eine Abnahme von ADP, die aber nicht das gleiche Ausmaß wie die ATP-Zunahme erreicht. Diese Diskrepanz ergibt sich wahrscheinlich durch die, bei diesen Versuchen nicht erfaßbaren, Änderungen im Adenosinmonophosphat-Spiegel. Auch ATP- und ADP-Konzentration erreichen nach 30 min wieder den Ausgangswert. (Abbildung 6)

b) Licht/Dunkel-Übergang in Luft + CO₂. (Abbildung 7)

Ausschalten des Lichtes bewirkt (Abbildung 7) einen 75 %igen Anstieg der PGS in den ersten 30 sec. Gleichzeitig erfolgt die Abnahme des FDP um ca. 80 % und der Triosen um ca. 70 %, während der 85 %ige Anstieg der PEB langsamer erfolgt.

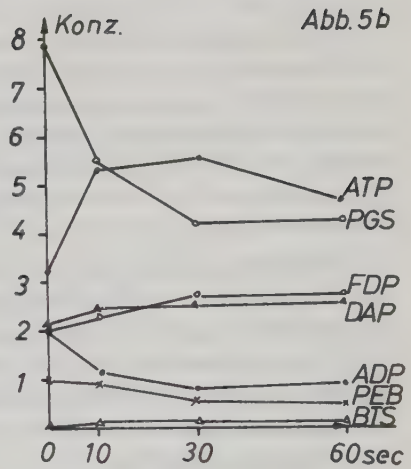
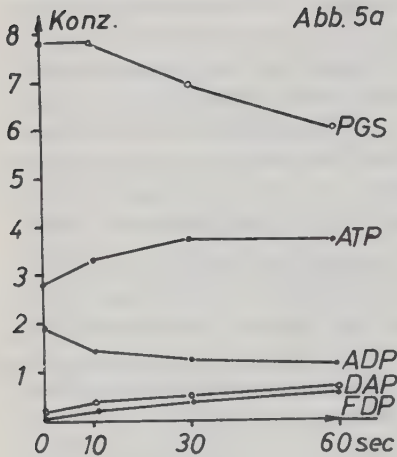


Abbildung 5:

Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen beim Dunkel/Licht-Übergang in Abhängigkeit von der Dichte der Algensuspension.

a = 28 %ige Algensuspension

b = 14 %ige " "

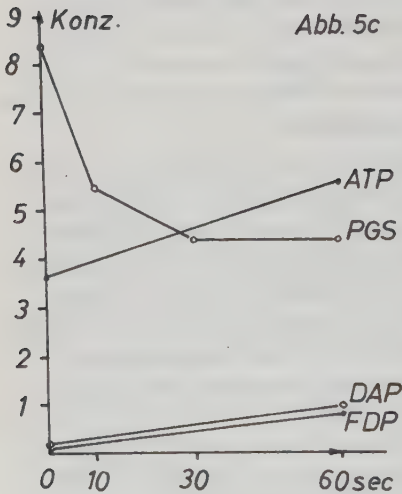
c = 7 %ige " "

Abbildung 5b: DAP und FDP additiv um $2 \cdot 10^{-4} \text{ m}$ vermehrt.

DAP = DAP + GAP = Summe der Triosephosphate.

Gasphase: Luft + 0,5 % CO_2 ;

Konzentration $\cdot 10^{-4} \text{ m}$.



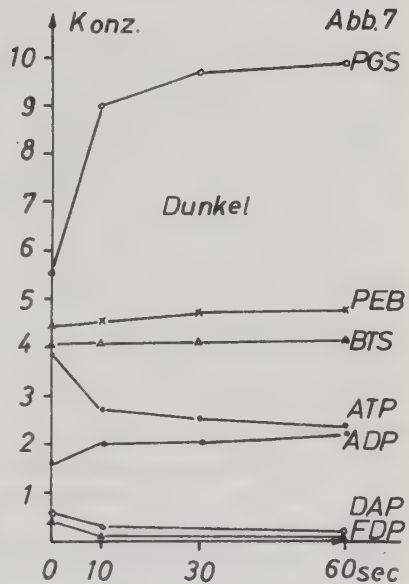
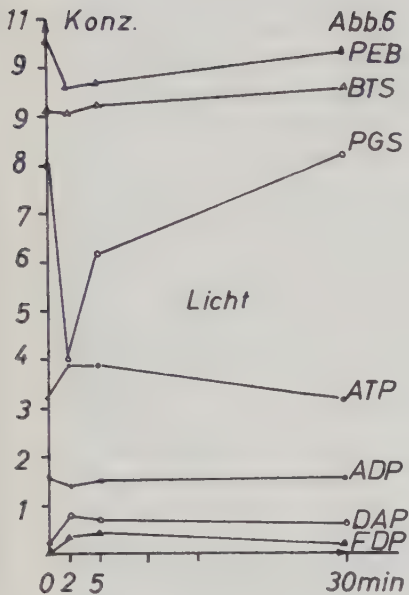


Abbildung 6: Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen beim Dunkel/Licht-Übergang.

PEB und BTS additiv um $9 \cdot 10^{-4} \text{ m}$ vermehrt;
 PGS additiv um $7 \cdot 10^{-4} \text{ m}$ vermindert. Konzentration =
 $\cdot 10^{-4} \text{ m}$. 14 %ige Algensuspension. Gasphase: Luft
 + 0,5 % CO_2 .

Abbildung 7: Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen beim Licht/Dunkel-Übergang.

PEB und BTS additiv um $4 \cdot 10^{-4} \text{ m}$ vermehrt.
 Konzentration $\cdot 10^{-4} \text{ m}$. 14 %ige Algensuspension.
 Gasphase: Luft + 0,5 % CO_2 .

Parallel zur Abnahme von ATP in den ersten 10 sec zeigt ADP eine entsprechende, wenn auch nicht quantitativ gleichgroße, Zunahme. Der ATP-Spiegel erreicht innerhalb der ersten Minute noch kein Minimum. Diese Beobachtung steht im Einklang mit dem erst nach zwei Minuten auftretenden Maximum der anorganischen Phosphatkonzentration nach Kandler (30). In der bereits erwähnten Arbeit (s. S. 24) verglichen Bassham und Mitarb. (5,6) die CO_2 -Fixierungsrate im Licht mit der PGS-Bildungsrate nach Ausschalten des Lichtes. Da sich ein Verhältnis von 1 : 2 ergab, wurden diese Versuchsergebnisse als Beweis dafür angesehen, daß für jedes fixierte CO_2 -Molekül 2 Moleküle PGS entstehen. Neuere Berechnungen von Bassham und Kirk (7) aus Versuchen am stationären Fließgleichgewicht, ergaben jedoch, daß das Verhältnis von CO_2 -Fixierungsrate zu PGS-Bildungsrate nur 1 : 1 beträgt.

Um einen direkten Vergleich zwischen CO_2 -Fixierungsrate und PGS-Bildungsrate zu ermöglichen, wurde folgender Versuch gemacht: Ein Teil der Algensuspension ($\text{pH} = 5$) wurde 20 min lang vorbelichtet und während dieser Zeit mit CO_2 -freier Luft durchströmt. Daraufhin wurde eine $\text{NaHC}^{14}\text{O}_3$ -Lösung von bekannter spezifischer Aktivität eingespritzt, nach 3, 6 und 10 min Proben entnommen und die Fixierungsraten durch Messung der Radioaktivität aliquoter Mengen bestimmt. Da in diesem Zeitraum die Fixierungsraten praktisch gleich waren (weniger als 10 % Unterschied), wurde in Tabelle 1 jeweils der 6-Minuten-Wert eingetragen.

Im Parallelversuch wurde ein anderer Teil der Algensuspension unter den gleichen Bedingungen vorbelichtet und mit der gleichen Menge $\text{NaHC}^{12}\text{O}_3$ ($18 \mu\text{M}/\text{ml}$ Suspension) versetzt. Nach 6 min Fixierungsdauer wurde das Licht ausgeschaltet und während der ersten Sekunden Proben zur enzymatischen PGS-Bestimmung entnommen. Die Probenentnahme erfolgte möglichst kurzfristig (nach 3 und 6 sec), um Werte zu erhalten, die noch innerhalb des linearen Anstiegs liegen. Um Abweichungen ausgleichen zu können, wurde die PGS-Bildungsrate jeweils aus beiden Werten berechnet (s. Tabelle 1 und Tabelle 22). Außerdem wurde ein weiterer Teil der gleichen Algensuspension mit Bicarbonatpuffer $\text{pH} = 8,6$ versetzt und die O_2 -Entwicklung manometrisch gemessen. Als Parallele hierzu wurde der Licht/Dunkel-Übergang auch in Bicarbonatpuffer durchgeführt.

	PGS-Bildungsrate (siehe Abbildung 8)		CO ₂ -Fixierungsrate	
	I. Wert (2 bzw. 3 sec)	II. Wert (4,5,6 sec)	Bestimmung durch C ¹⁴ O ₂ - Fixierung (Dauer: 6 min)	Bestimmung durch mano- metr. Messg. der O ₂ -Entw.
a	37	40	30 (13°C)	50 (17°C)
b	39	40		70 (20°C)
c	35	40		
d	27	31		
e	39	56	50 (13°C)	61 (15°C)
f	63	58		75 (20°C)
g	61	57		

Tabelle 1: Vergleich zwischen PGS-Bildung und CO₂-Fixierung.

Versuchsreihe A = a - d; Versuchsreihe B = e - g;

Die Versuchsbedingungen sind in der Legende von
Abbildung 8 angegeben.

Alle Werte in $\mu\text{M}/\text{mg}$ Chlorophyll/h.

CO₂-Fixierungen in 3,5 %iger Suspension.

Abbildung 8 zeigt den enzymatisch gemessenen Wert des PGS-Anstiegs zweier Versuchsserien verschiedener Algengernten und Tabelle 1 die daraus berechneten Werte für die Geschwindigkeit der PGS-Bildung, verglichen mit den Kontrollwerten der C¹⁴O₂-Fixierung und der manometrischen Messung. Durch die geringere Schichtdicke der Algensuspension bei der manometrischen Messung und die damit verbundene höhere Lichtintensität, ergibt sich nur eine ungefähre Übereinstimmung der CO₂-Fixierungsraten. Die relativ niedrige Fixierungsrate von nur ca. 30 bzw. 50 μM CO₂/h/mg Chlorophyll ist höchstwahrscheinlich auf Temperatureinflüsse zurückzuführen. Der Lollipop wurde während der C¹⁴O₂-Fixierungen und der Licht/Dunkel-Übergänge durch Leitungswasser von 13°C gekühlt. Die manometrischen Messungen zeigen

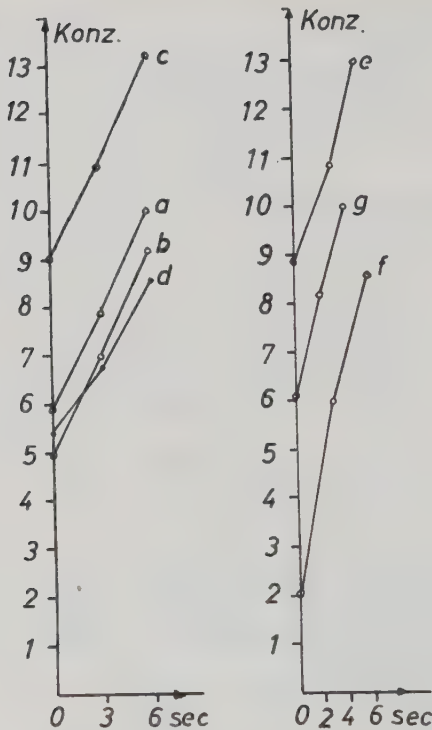


Abbildung 8: PGS-Bildung beim Licht/Dunkel-Übergang.

20 min Vorbelichtung ohne CO_2 ; Werte additiv vermindert um: $10 \cdot 10^{-4}\text{m}$ (a); $5 \cdot 10^{-4}\text{m}$ (b,c); $12 \cdot 10^{-4}\text{m}$ (e,f,g,);

Versuchsreihe A = a - d; Versuchsreihe B = e - g;

Lichtintensität = 50 000 Lux; $T = 13^\circ\text{C}$; Konzentrat. $\cdot 10^{-4}\text{m}$

a = 3,5 %ige Suspension, 6 min nach Bicarbonatzugabe (pH=5)

b = 3,5 %ige " " , in Bicarbonatpuffer (pH=8,6)

c = 7,0 %ige " " , " " "

d = 7,0 %ige " " , ohne Bicarbonat

e = 3,5 %ige " " , 6 min nach Bicarbonatzugabe (pH=5)

f = 3,5 %ige " " , in Bicarbonatpuffer (pH=8,6)

g = 7,0 %ige " " , 6 min nach Bicarbonatzugabe (pH=5)

deutlich die Abhängigkeit der Photosynthese von der Temperatur.

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, ergibt sich größenordnungsmäßig eine gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der verschiedenen Arbeitsmethoden. Die PGS-Bildung und die CO_2 -Fixierung verhalten sich ungefähr wie 1 : 1, und es wäre somit eine Bestätigung für die neuere Ansicht von Bassham und Kirk (7) erbracht, daß pro Mol CO_2 nur ein Mol PGS entsteht.

Auffällig ist aber die Tatsache, daß die PGS-Bildungsrate bei verschiedener Algendichte, also unterschiedlicher Lichtintensität, stets gleich bleibt. (Tabelle 1) und sogar bei einem Parallelversuch ohne CO_2 (Tabelle 1: "d") fast den gleichen Wert hat. Da die C^{14} -Fixierungsraten bei beiden Versuchsserien ungefähr im gleichen Bereich ($30 - 50 \mu\text{M}/\text{mg Chlorophyll/h}$) lagen, war die Annahme möglich, daß sich die Übereinstimmungen nur zufällig ergaben und es wurde daher in einem weiteren Versuch durch Veränderung der Lichtintensität und der Temperatur die Fixierungsrate variiert und mit dem entsprechenden PGS-Anstieg nach Verdunklung verglichen. Das Ergebnis ist aus Tabelle 2 und Abbildung 9 ersichtlich. Der Erhöhung der CO_2 -Fixierung auf das Neunfache steht eine praktisch gleichbleibende PGS-Bildungsrate gegenüber. Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutung, daß das Verhältnis von CO_2 -Fixierung zu PGS-Bildung nur in einem bestimmten Bereich 1 ist, und sich je nach Lichtintensität und Temperatur verändert. Es besteht also kein direkter Zusammenhang zwischen beiden Größen.

Wenn die Annahme von Bassham richtig ist, daß die PGS aus RuDP durch Carboxylierung entsteht, so müßte CO_2 -Entzug den PGS-Anstieg verhindern. In Abbildung 8 und Tabelle 1 ("d") ist bereits ein Versuch enthalten, der keine Bestätigung dieser Forderung bringt. Es wurden daher weitere Versuche bei Anwesenheit von CO_2 gemacht.

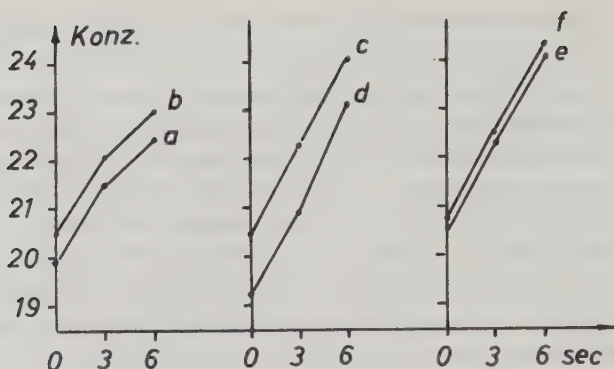


Abbildung 9: PGS-Bildung beim Licht/Dunkel-Übergang in Abhängigkeit von Lichtintensität und Temperatur. Nach 20 min Vorbelichtung ohne CO_2 ; Zugabe von Bicarbonat ($18 \mu\text{M NaHCO}_3/\text{ml}$ Algensuspension). Ausschalten des Lichtes nach 6 min Fixierunsdauer. pH = 5; Konzentration $\cdot 10^{-4}\text{m}$. Lichtintensität, Temperatur und Konzentration der Algensuspensionen sind aus Tabelle 2 ersichtlich.

Konzentration d. Algensusp.	Temperatur	Lichtintensität (Lux)	PGS-Bildungs- geschwindigk.		C^{14}O_2 -Fixierungs- rate (6 min-Wert)
			3 sec	6 sec	
a = 3,5 %ig	13°C	5 000	31	25	20
b = 7 %ig	"	"	31	25	11
c = 3,5 %ig	13°C	25 000	37	35	44
d = 7 %ig	"	"	33	38	27
e = 3,5 %ig	27°C	50 000	34	34	97
f = 7 %ig	"	"	34	35	64

Tabelle 2: Vergleich zwischen PGS-Bildungsgeschwindigkeit und C^{14}O_2 -Fixierungsrate in Abhängigkeit von Lichtintensität und Temperatur.

Alle Werte in $\mu\text{M/mg}$ Chlorophyll/h.

c) Dunkel/Licht- und Licht/Dunkel-Übergang in Luft ohne CO₂.

Zum Entfernen des CO₂ wurde die Luft durch Natronkalk, Natronlauge und gesättigte Bariumhydroxydlösung geleitet. Die Geschwindigkeit betrug 1 l/min.

Die aus Abbildung 10 ersichtlichen Konzentrationsveränderungen der Zwischenstoffe zeigen nur geringe Abweichungen gegenüber der Kinetik bei Gegenwart von CO₂. (Abbildung 5, 7) Das Fehlen der CO₂-Fixierung begünstigt offenbar die Lichtphosphorylierung, sodaß der im Licht erhöhte ATP-Spiegel auch noch nach 10 min keine Abnahme zeigt. Andererseits geht die Zunahme der Zuckerphosphate im Licht durch Mangel an CO₂ bereits nach 30 sec wieder zurück.

Aus dem sehr lang anhaltenden PGS-Anstieg (Abbildung 11) errechnet sich im Durchschnitt eine PGS-Bildungsrate von 15 μ M PGS/ mg Chlorophyll/h nach Ausschalten des Lichtes. Ein Parallelversuch mit kurzfristiger Probenentnahme ergab für den 3- bzw. 6 sec-Wert wieder eine Geschwindigkeit von 32 μ M/mg Chlorophyll/h und entspricht damit dem Versuch "d" in Abbildung 8.

Dieser Befund steht im Widerspruch zu der Annahme, daß PGS durch Caroxylierung entsteht und es könnte daher vermutet werden, daß trotz des kräftigen CO₂-freien Luftstromes (bei pH = 4,8) das Atmungs-CO₂ nicht rasch genug entfernt wurde. Aber selbst wenn man annimmt, daß das gesamte Atmungs-CO₂ für die Caroxylierung zur Verfügung stand, würde^{die} bei der Leeratmung durchschnittlich gebildete Menge von 5 μ M CO₂/mg Chlorophyll/h nicht für den beobachteten PGS-Anstieg von 15 - 25 μ M/mg Chlorophyll/h ausreichen. Daher scheidet auch die Atmung als CO₂-Quelle aus. Ein weiteres Argument gegen die PGS-Bildung aus RuDP sind die Messungen der RuDP-Konzentration.

Die Empfindlichkeit des RuDP-Testes ist wesentlich geringer als z. B. die Empfindlichkeit des FDP-Testes. Trotzdem ist eine Bestimmung von 0,1 μ M RuDP (als unterste Grenze) noch möglich. Wenn man annimmt, daß die stationäre RuDP-Konzentration in der Größenordnung der FDP-Konzentration (0,02 μ M) liegt, so ist verständlich, daß bei den Versuchen unter den üblichen Photosynthesebedingungen kein RuDP nachgewiesen werden konnte.

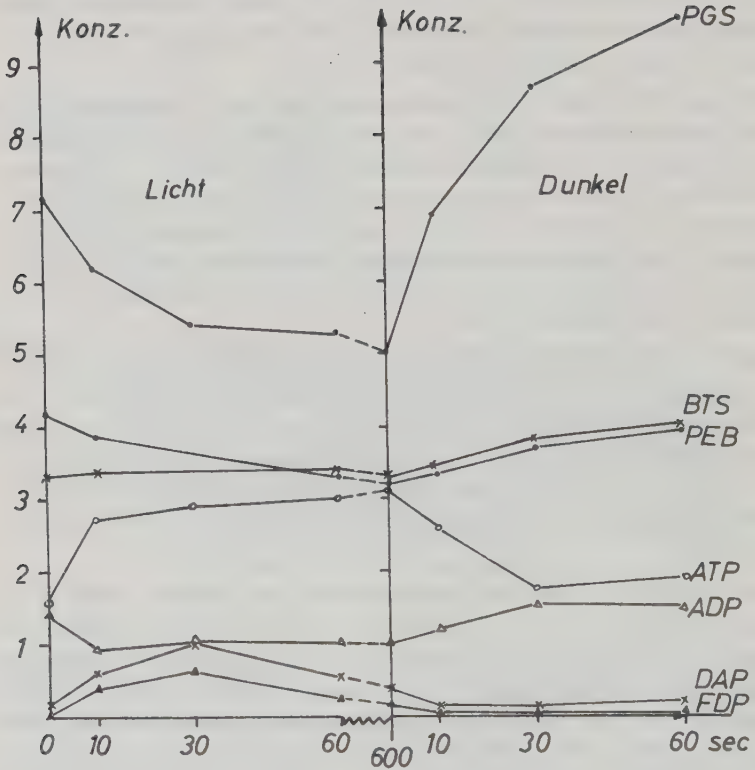


Abbildung 10: Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen beim Dunkel/Licht- und Licht/Dunkel-Übergang in Luft ohne CO_2 .

PEB und BTS additiv um $3 \cdot 10^{-4} \text{ m}$ vermehrt.

pH = 4,8; 14 %ige Algensuspension;

Konzentration $\cdot 10^{-4} \text{ m}$.

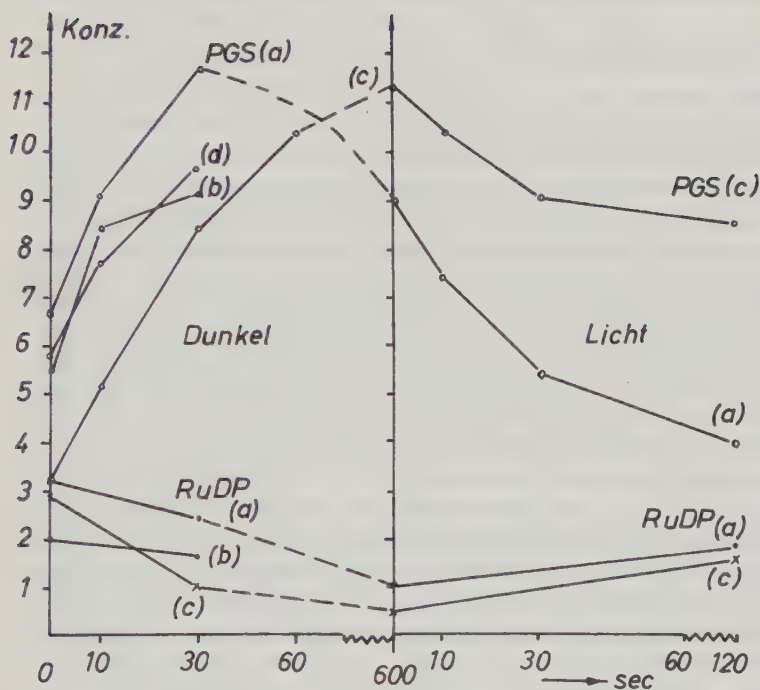


Abbildung 11: Veränderungen der PGS- und RuDP-Konzentrationen beim Licht/Dunkel- und Dunkel/Licht-Übergang in Luft ohne CO_2 .

Bei 0 Ausschalten des Lichtes nach 20 min Vorbelichtung. Bei den Versuchen a), b), c) 30 min Vorinkubation mit Glucose (1 %). PGS-Werte additiv um $5 \cdot 10^{-4} \text{ m}$ vermindert. Konzentration $\cdot 10^{-4} \text{ m}$; 14 %ige Algensuspension.

Nur bei Abwesenheit von CO_2 und vorheriger Glukosefütterung lag RuDP in meßbarer Konzentration vor, da es ja unter diesen Bedingungen angereichert wird. Die Notwendigkeit der Glukosefütterung legt die Vermutung nahe, daß der Zuckergehalt der verarmten Algen zu niedrig war, um größere Mengen an RuDP zu bilden.

Einer Zunahme von $0,5/\mu\text{M}$ PGS entspricht nur eine Abnahme des RuDP um ca. $0,07/\mu\text{M}$ (Versuch "a" - Abbildung 11). Wenn die PGS aus RuDP entsteht, so müßte der Bildung von $0,5/\mu\text{M}$ PGS aber eine Abnahme von $0,25/\mu\text{M}$ RuDP gegenüberstehen. Man könnte höchstens noch annehmen, daß auch nach Ausschalten des Lichtes aus Zuckerphosphaten RuDP laufend nachgebildet wird.

Als andere Quelle der PGS kommt noch die Glykolyse in Betracht. Normalerweise beträgt die Geschwindigkeit der Glykolyse im "steady-state" nur wenige μM , wie aus der CO_2 -Bildungsrate von $5/\mu\text{M}$ CO_2/mg Chlorophyll/h zu schließen ist, wenn man annimmt, daß die gebildete PGS nicht in vollem Umfang zu CO_2 gespalten, sondern teilweise auch assimiliert wird. Diese Glykolyse-Geschwindigkeit würde aber nicht ausreichen, um den raschen Anstieg der PGS zu erklären. Da jedoch im Licht eine Verschiebung des Konzentrationsverhältnisses von PGS/DAP + FDP zugunsten der Zucker vorliegt, ist anzunehmen, daß die Oxydation nach Ausschalten des Lichtes vorübergehend beschleunigt wird, wie aus dem raschen Abfall des FDP und der Triosen ersichtlich ist.

Diese rasche Oxydation von DAP und FDP äußert sich auch in einer erhöhten Atmung, wie sie bereits verschiedentlich gemessen wurde (30, 75, 18). Der erhöhte Umsatz läßt sich mit seiner vollen Rate nur an der primär auslösenden Reaktion, der Trioseoxydation, messen. Die Erhöhung der O_2 -Aufnahme, als letzte Auswirkung, ist erheblich geringer, da zwischen der Stufe der PGS-Bildung und der O_2 -Entwicklung viele Zwischenstufen eingeschaltet sind, die die Anfangsgeschwindigkeit gewissermaßen abpuffern. Die absolute Menge, um die die Triosen und FDP abnehmen, ist zwar gering, aber die Geschwindigkeit der Abnahme (im Gegensatz zu der langsamen Abnahme des RuDP) macht es wahrscheinlich, daß ein erhöhter Durchsatz von den Zuckerphosphaten her erfolgt.

Werden die PGS-Konzentrationsveränderungen durch die Trioseoxydation verursacht, so müßten sie bei Abwesenheit von Sauerstoff ausbleiben. Aus diesem Grund wurden Versuche unter anaeroben Bedingungen ausgeführt.

d) Licht/Dunkel-Übergang in Stickstoffatmosphäre ohne bzw. mit CO_2 . (Abbildungen 12 und 13)

Abbildung 12 zeigt das Ergebnis mehrerer Versuche unter Stickstoff ohne CO_2 , die mit Algen verschiedener Ernte durchgeführt wurden. Die sich entsprechenden Kurven eines Versuches haben gleiche Bezeichnung. Auch in diesem Fall konnte RuDP nur dann nachgewiesen werden, wenn die Algen vor Versuchsbeginn 30 min lang mit Glukose gefüttert wurden. Bei Abwesenheit von CO_2 zeigt die PGS beim Ausschalten des Lichtes wie erwartet keinen, oder nur einen sehr geringen Anstieg. Da die Atmung gehemmt ist, nimmt auch die Triose- und die FDP-Konzentration nur wenig und langsam ab. Die RuDP-Konzentration nimmt dagegen in gleicher Weise ab wie bei den Versuchen in Luft ohne CO_2 , ohne daß dadurch PGS angereichert wird.

Beobachtet man andererseits die Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen beim Licht/Dunkel-Übergang unter Stickstoff mit CO_2 , so zeigt sich wieder eine PGS-Zunahme (Abbildung 13). Der Anstieg ist allerdings, verglichen mit den Versuchen in Luft mit und ohne CO_2 , verhältnismäßig gering. Wie bei Gegenwart von Sauerstoff nehmen die Triosen und FDP sofort ab. Es liegt daher die Vermutung nahe, daß der durch die CO_2 -Fixierung im Licht gebildete Sauerstoff nicht restlos durch den Gasstrom ausgetrieben wurde, sodaß genügend Sauerstoff für die Trioseoxydation zur Verfügung stand.

Abb.12

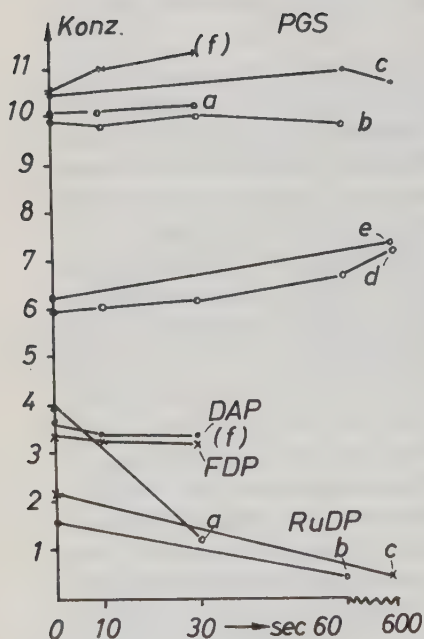


Abb.13

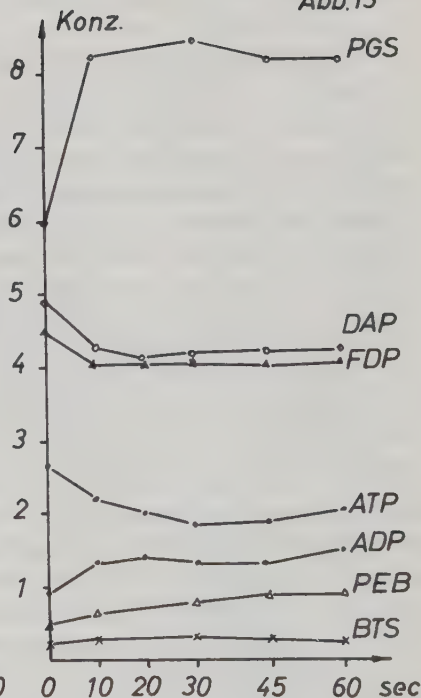


Abbildung 12: Veränderungen einiger Zwischenstoffkonzentrationen beim Licht/Dunkel-Übergang in Stickstoff-Atmosphäre. Bei 0 Ausschalten des Lichtes nach 20 min Vorbelichtung. Bei den Versuchen a), b), c) 30 min Vorinkubation mit Glucose (1 %). In Versuch f) PGS um $1 \cdot 10^{-4}m$ vermehrt, DAP und FDP additiv um $3 \cdot 10^{-4}m$ vermehrt; Konzentration $\cdot 10^{-4}m$; 14 %ige Algensuspension.

Abbildung 13: Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen beim Licht/Dunkel-Übergang in Stickstoff + 5 % CO_2 . DAP und FDP additiv um $4 \cdot 10^{-4}m$ vermehrt; Konzentration $\cdot 10^{-4}m$; 14 %ige Algensuspension.

III. Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen bei unterschiedlicher CO_2 -Konzentration im Licht.

a) Übergang von Luft + CO_2 -Begasung zu Luft ohne CO_2 im Licht und umgekehrt. (Abbildungen 14 und 15)

Die Algensuspension wurde 10 bis 15 min im Licht von Luft + CO_2 durchspült und dann die CO_2 -Zufuhr unterbrochen (Abbildung 14). Die Abnahme von PGS erfolgt relativ langsam, was wahrscheinlich durch das nur allmähliche Austreiben des in der Suspension gelösten CO_2 bedingt ist. FDP und PEB sinken ebenfalls, während der ATP-Spiegel eine Zunahme zeigt. Wird andererseits CO_2 (als Gas oder als Bicarbonat) der an CO_2 verarmten Suspension zugeführt, so zeigt sich in Abbildung 15 ein 80 %iger Anstieg der PGS und eine Zunahme der PEB um das 7-fache. Der Verlauf der PGS-Konzentration entspricht der Kinetik bei den Versuchen von Wilson und Calvin (81). Nach 60 sec erreichen BTS und FDP das Doppelte des jeweiligen Ausgangswertes und die Triosen nehmen um 30 % zu. Demgegenüber sinkt der ATP-Spiegel, begleitet von einer Zunahme an ADP.

Während sich die Konzentrationsveränderungen bei Licht/Dunkel-Übergängen in Luft als praktisch unabhängig von der CO_2 -Konzentration erwiesen (Versuche mit 2,5 % CO_2 ergaben das gleiche Bild wie mit 0,5 % CO_2 bzw. ohne CO_2), hat die Zugabe bzw. der Entzug von CO_2 im Licht einen deutlichen Einfluß auf die verschiedenen "pools". Zugabe von CO_2 im Licht bewirkt fast die gleichen Veränderungen wie plötzliches Verdunkeln. Einen wesentlichen Unterschied zeigen nur die Triosen und FDP, die im Dunkeln abnehmen, während sie bei Zugabe von CO_2 im Licht natürlich zunehmen. Das gleiche gilt für den Vergleich zwischen CO_2 -Entzug und Dunkel/Licht-Übergang.

b) Übergang von N_2 + CO_2 -Begasung zu N_2 -Begasung im Licht und umgekehrt. (Abbildungen 16 und 17)

Diese Versuche wurden in gleicher Weise ausgeführt wie die entsprechenden Versuche in Luft. Wird nach 10 min Begasung mit Stickstoff und CO_2 die CO_2 -Zufuhr unterbrochen, so zeigen sich nur geringfügige Konzentrationsveränderungen, die auch hier wahrscheinlich auf die Löslichkeit des CO_2 in Wasser zurück-

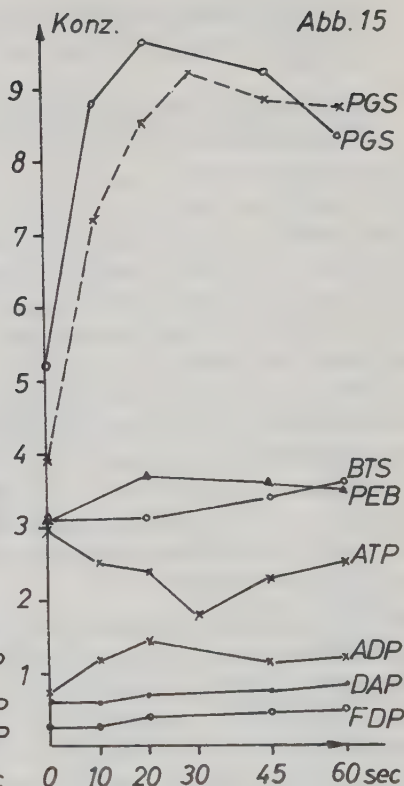
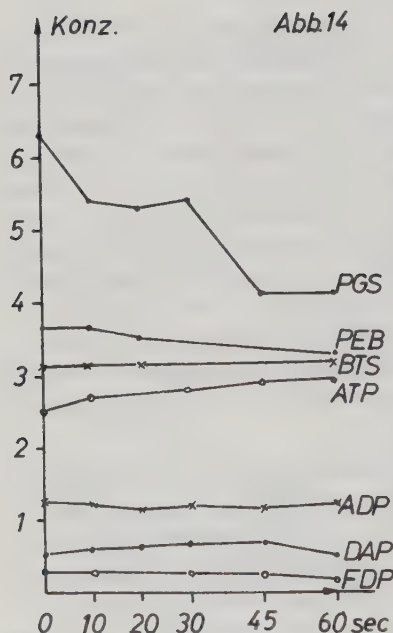


Abbildung 14: Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen beim Entzug von CO_2 im Licht.

Nach 10 min Belüftung mit Luft + 2,5 % CO_2 im Licht, Unterbrechung der CO_2 -Zufuhr bei 0; pH = 4,8; 14 %ige Algensuspension; Konzentration $\cdot 10^{-4}\text{m}$.

Abbildung 15: Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen bei Zufuhr von CO_2 zu einer an CO_2 verarmten Algensuspension im Licht.

Nach 10 min Belüftung mit Luft ohne CO_2 , Zugabe von CO_2 bei 0; pH = 4,8; x-----x = PGS-Konzentration nach Zugabe von $2 \cdot 10^{-3}\text{m}$ NaHCO_3 ; PEB und BTS additiv um $3 \cdot 10^{-4}\text{m}$ vermehrt; Konzentration $\cdot 10^{-4}\text{m}$; 14 %ige Algensuspension.

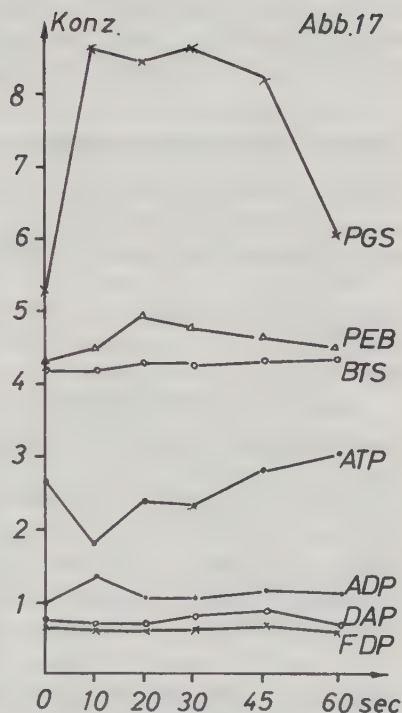
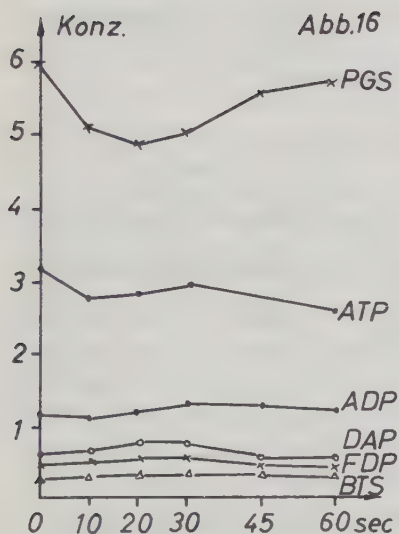


Abbildung 16: Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen beim CO_2 -Entzug im Licht unter Stickstoffatmosphäre. Nach 10 min Begasung mit $\text{N}_2 + 5\% \text{CO}_2$, Unterbrechung der CO_2 -Zufuhr bei 0. pH = 4,8; 14 %ige Algensuspension; BTS = BTS + PEB; Konzentration $\cdot 10^{-4}\text{m}$.

Abbildung 17: Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen bei Zufuhr von CO_2 zu einer an CO_2 verarmten Algensuspension im Licht unter Stickstoff-Atmosphäre. Nach 10 min Begasung mit N_2 , Zugabe von CO_2 bei 0. pH = 4,8; BTS und PEB additiv um $4 \cdot 10^{-4}\text{m}$ vermehrt; 14 %ige Algensuspension; Konzentration $\cdot 10^{-4}\text{m}$.

zuführen ist. Plötzliche Zufuhr von CO_2 zu der an CO_2 verarmten Suspension verursacht einen kräftigen, wenn auch kurzfristigen PGS-Anstieg, begleitet von einer Abnahme an ATP und einer, zeitlich etwas verzögerten PEB-Zunahme.

Überblick über die Ergebnisse von Teil II und III.

Zunächst werden die absoluten Werte der Zwischenstoffkonzentrationen im "steady-state" mit den entsprechenden Versuchsergebnissen von Bassham und Mitarb. (5,7) verglichen.

Zwischenstoff	Licht			Dunkel	
	Werte aus Abb. 6	Bassham u. Mitarb. 1956	1961	Werte aus Abb. 6	Bassham u. Mitarb. 1956
PGS	1,52	1,63	1,0	1,5	2,42
RuDP	(0,2-0,4) ^x	0,51	0,07	—	0,0005
FDP	0,02	0,004	(0,1)	0,005	0,001
Triosen	0,06	0,21	0,3	0,03	0,12

Tabelle 3: Zwischenstoffkonzentrationen im stationären Fließgleichgewicht.

Die Werte beziehen sich auf $\mu\text{M}/\text{ml}$ nasse Algenmasse.

^x) RuDP-Konzentration nach Glukosefütterung bei Abwesenheit von CO_2 . (Abbildungen 11 und 12)

Die beste Übereinstimmung mit den Werten von Bassham und Mitarb. (1956) ergibt sich bei einem Vergleich der PGS-Konzentrationen. Allerdings konnte in den eigenen Versuchen im stationären Zustand kein Unterschied zwischen Licht- und Dunkelwert festgestellt werden. Zu- und Abnahme der PGS beim Aus- oder Einschalten des Lichtes waren lediglich Induktionserscheinungen, die in den darauffolgenden Minuten wieder ausgeglichen wurden.

Besonders auffällig ist der Unterschied der RuDP-Konzentration.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Bradley (9,10) konnte in eigenen Versuchen RuDP nur bei Abwesenheit von CO_2 in meßbaren Mengen gefunden werden. Dabei handelt es sich natürlich nicht um eine stationäre Konzentration, da sie nur durch Anreicherung erzeugt wurde. In der neueren Arbeit (1961) finden auch Bassham und Mitarb. wesentlich weniger RuDP. Dieser Wert von $0,07 \mu\text{M}$ RuDP liegt nahe an der Erfassbarkeitsgrenze unserer Methode.

Weniger auffällig sind die Unterschiede beim FDP. Die durch unsere Methode festgestellte Konzentration beträgt im Licht und im Dunkeln ungefähr das 5-fache der entsprechenden Werte von Bassham und Mitarb. (1956). Allerdings errechnet sich aus den neueren Versuchsdaten (1961) ein wesentlich höherer Wert (ca. $0,1 \mu\text{M}/\text{ml}$ Algenmasse), der die von uns gefundenen Werte noch übertrifft. Eine Erhöhung der FDP-Konzentration im Licht auf das 4-fache, gegenüber der Konzentration im Dunkeln, geht sowohl aus den Versuchen von Bassham und Mitarb. als auch aus den eigenen hervor.

Ähnlich ist es bei einem Vergleich der Triosephosphat-Konzentrationen. Die Werte aus Abbildung 6 sind in diesem Fall niedriger als die Werte von Bassham und Mitarb., die das 3- bis 5-fache betragen, aber der Unterschied zwischen Licht und Dunkel ist in beiden Fällen der gleiche. Im Licht liegt der DAP-Spiegel doppelt so hoch wie im Dunkeln.

Versucht man die Induktionserscheinungen, die bei Dunkel/Licht bzw. Licht/Dunkel-Übergang auftreten, an Hand des Photosynthesecyklus nach Calvin (siehe Einleitung) zu erklären, so ergeben sich folgende Zusammenhänge: Einschalten des Lichtes bewirkt Reduktion und damit plötzliche Abnahme der PGS, begleitet von einer Abnahme der PEB. Das bedeutet, daß die Reduktion der PGS schneller einsetzt, als die Bildung durch Carboxylierung des RuDP, das erst mit Hilfe des Lichtes phosphoryliert werden muß. Diese Vorstellung hat zur Voraussetzung, daß der PGS-Anteil des Chloroplasten mindestens so groß ist wie diese Abnahme der Gesamtmenge, oder daß zwischen Plasma und Chloroplast ein guter Austausch stattfindet, sodaß die Reduktion den allgemeinen "PGS-pool" betrifft.

Die Reduktion der PGS führt zur Zunahme der Triosen und des FDP.

Außerdem steigt der ATP-Spiegel durch Einsetzen der Lichtphosphorylierung, was eine Abnahme der ADP-Konzentration verursacht. Umgekehrt wird durch Verdunkeln die Reduktion gestoppt, PGS reichert sich vorübergehend an, da die CO_2 -Fixierung erst aufhört, wenn der Vorrat an CO_2 -Akzeptor, dessen Bildung seinerseits durch Licht beeinflusst wird, aufgebraucht ist. Ebenso nimmt PEB zu, da der PGS-Abbau jetzt wieder ausschließlich über die Atmung läuft. Die Triosen und FDP nehmen ab. Aufhören der Lichtphosphorylierung bewirkt eine Abnahme von ATP und Zunahme an ADP.

Unter normalen Bedingungen (Luft + CO_2) werden diese Schwankungen in den darauffolgenden Minuten ausgeglichen, sodaß nach 10 - 30 Minuten ein neues, dem Ausgangsniveau sehr ähnliches Fließgleichgewicht entsteht. Die Zuckerphosphate bleiben allerdings auf ein Mehrfaches der Ausgangskonzentration erhöht.

Bei Abwesenheit von CO_2 ist der Triose- und FDP-Anstieg nur vorübergehend, da keine Carboxylierung mehr stattfinden kann. Andererseits wird die Lichtphosphorylierung durch das Fehlen der CO_2 -Fixierung begünstigt, sodaß der ATP-Spiegel auch nach 10 min noch keine Abnahme zeigt.

Die Zunahme ist bei den beschriebenen Versuchen unter allen Bedingungen deutlicher als bei den Versuchen von Bradley (10) und entspricht, wie schon erwähnt wurde, dem von Kandler beobachteten Verlauf des anorganischen Phosphates. Dieser ATP-Anstieg im Licht scheint im Widerspruch zu den Ergebnissen von Goodman und Mitarb. (24) und Simonis und Mitarb. (70) zu stehen. Bei den Versuchen von Goodman und Mitarb. (24) enthält ATP, 30 sec nach Zugabe von P^{32} im Dunkeln, ca. 70 % der Gesamtaktivität gegenüber 10 % unter den gleichen Bedingungen im Licht. Wurde die Inkubationszeit auf 60 min verlängert, so betrug der Aktivitätsanteil des ATP im Licht 17,6 % gegenüber 27,5 % im Dunkeln. Auch wenn nach 60 min Einlagerungszeit im Licht 15 min lang verdunkelt wurde, so stieg der Aktivitätsanteil von 17,6 % (im Licht) auf 29,7 % (im Dunkeln). Nach den Versuchen von Simonis und Mitarb. (70) ist der Aktivitätsanteil des ATP im Dunkeln, 3 min nach Zugabe von P^{32} , doppelt so hoch als unter den gleichen Bedingungen im Licht.

Dieser Widerspruch zu den eigenen Ergebnissen beruht auf der

Tatsache, daß die Versuche mit P^{32} nur den relativen Umsatz im Verhältnis zu den Zuckerphosphaten und nicht die absolute Menge des ATP wiedergeben.

Die Abnahme der PGS, die durch den CO_2 -Entzug im Licht erfolgt, erklärt sich auf der Basis des Photosynthesecyklus nach Calvin durch die verminderte CO_2 -Fixierung und damit verminderte Bildung von PGS, während umgekehrt Zugabe von CO_2 durch erhöhte CO_2 -Fixierung zu einem Anstieg der PGS-Konzentration führt.

Schwierigkeiten bei der Erklärung der Induktionserscheinungen der Zwischenstoffe bietet aber die Frage der PGS-Bildung nach Verdunkeln. Wie bereits auf Seite 36 angedeutet wurde, entspricht die Abnahme an RuDP, falls überhaupt welches gefunden wurde, nicht der PGS-Bildung nach Ausschalten des Lichtes. (Abbildung 11).

Durch die Versuche, die einen direkten Vergleich zwischen CO_2 -Fixierung und PGS-Bildung bei verschiedener Lichtintensität und Temperatur brachten (Tabelle 2), konnte bewiesen werden, daß die beiden Vorgänge nicht in direkter Beziehung zueinander stehen. Unterschiedlichen CO_2 -Fixierungsraten entsprach eine gleichbleibende PGS-Bildungsgeschwindigkeit. Diese Tatsache und die Beobachtung, daß die PGS-Konzentration nach Verdunklung in CO_2 -freier Luft praktisch die gleiche Zunahme zeigt, geben einen Hinweis darauf, daß nach Ausschalten des Lichtes die Glykolyse vorübergehend mit maximaler Geschwindigkeit einsetzt. Auch die Abnahme der PGS, nach Einschalten des Lichtes, kann man entsprechend durch eine Hemmung der Atmung bzw. Glykolyse durch die einsetzende Photosynthese erklären.

Eine Atmungshemmung durch die Photosynthese wurde bereits mehrfach beobachtet (6,12,30,42). Bassham und Calvin (6) führten die Hemmung der Atmung durch Licht auf den Mangel an oxydierter α -Liponsäure zurück, die zur oxydativen Decarboxylierung der Brenztraubensäure nötig ist. Demzufolge müßte man nach Einschalten des Lichtes einen BTS-Anstau erwarten, der aber nicht eintritt (Abbildung 5b). Erst nach 30 min ist eine merkliche Zunahme, zusammen mit einem PEB-Anstieg zu beobachten (Abbildung 6). Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die Atmungshemmung wäre die Hemmung der Glykolyse durch Mangel an DPN^+ . Duysens (16) glaubte, spektrometrisch eine Verschiebung des

DPN⁺/DPN-H-Verhältnisses zugunsten der reduzierten Form festgestellt zu haben. Im Widerspruch dazu konnte durch Untersuchungen von Chance und Mitarb. (14) und Oh-Hama und Mitarb. (55) eine entgegengesetzte Verschiebung beobachtet werden. Daraus ergäbe sich aber eher eine verstärkte Glykolyse als ein gehemmte.

Eine dritte Erklärungsmöglichkeit knüpft an die Vorstellungen Lynens (50) über die Entstehung des Pasteureffektes an. Bekanntlich beruht nach Lynen der Pasteureffekt, d. h. die Hemmung der Gärung durch die Atmung, auf einem Mangel an anorganischem Phosphat bei der Triosephosphatoxydation und einem Mangel an ADP an der Stufe der PEB, da anorganisches Phosphat und ADP für die Atmungskettenphosphorylierung gebraucht werden.

Wie der Anstieg des ATP und der Abfall der anorganischen Phosphat-Konzentration (37) zeigen, wird der Zelle durch die Lichtphosphorylierung anorganisches Phosphat und ADP entzogen und dadurch die Atmung gehemmt. Man muß annehmen, daß sich für die "Affinität zum anorganischen Phosphat" folgende Reihenfolge ergibt: Lichtphosphorylierung > Atmungskettenphosphorylierung > Glykolyse.

Das Einsetzen einer dieser Reaktionen bewirkt in jedem Falle eine kompetitive Hemmung der in der Reihenfolge nach ihr stehenden.

Ist dies richtig, so wirkt sich der Mangel an anorganischem Phosphat nach Einsetzen der Lichtphosphorylierung am stärksten auf die Triosephosphatoxydation aus und würde durch diese Hemmung einerseits zu einer Abnahme an PGS und andererseits zu einer Zunahme der Triosen und des FDP führen, wie man es bei der Hemmung der Triosephosphatoxydation durch MJE beobachten kann (siehe nächstes Kapitel).

Wendet man diese Argumentation auch auf die Versuche über den CO₂-Entzug im Licht an, so kann man folgendes sagen: Entzug von CO₂ in Abbildung 14 bedingt optimale Wirksamkeit der Lichtphosphorylierung, da der im Licht erzeugte Reduktand nicht mehr zur Reduktion des fixierten CO₂ gebraucht wird, sondern der Rekombination und damit der Bildung von energiereichem Phosphat zur Verfügung steht, ATP nimmt zu und außerdem wird RuDP

(Abbildung 11) angereichert, sodaß der anorganische Phosphat-spiegel notwendigerweise stark absinkt. Die Hemmung der Glykolyse muß dabei den maximalen Wert erreichen, was sich in einer erneuten Abnahme der PGS-Konzentration zeigt, während die Triosen noch mehr zunehmen.

Wird der CO_2 -Entzug unter Stickstoff ausgeführt, so ist die Abnahme der PGS schwächer und nur vorübergehend, da die Glykolyse durch Sauerstoffmangel ohnehin schon gehemmt ist und damit die Regulation durch anorganisches Phosphat an Bedeutung verliert.

Zufuhr von CO_2 im Licht bewirkt umgekehrt, wegen der Konkurrenz um den Reduktanden, eine Verminderung der Lichtphosphorylierung, was sich in einem Abfall der ATP- und Zunahme der ADP-Konzentration äußert. Eine bessere Versorgung mit anorganischem Phosphat und ADP ermöglicht in diesem Fall eine ähnliche Glykolysebeschleunigung wie beim Übergang von Licht in Dunkel und bewirkt einen PGS-Anstieg.

Aus diesen Betrachtungen ist ersichtlich, daß sich die Veränderungen der "pool-Größen" im allgemeinen ebensogut an Hand des Photosynthese-Schemas von Calvin erklären lassen, wie auch unter der Voraussetzung eines "PGA-by-pass" (siehe Einleitung). Die Tatsache, daß keine Beziehung zwischen RuDP-Konzentration und CO_2 -Fixierungsrate einerseits und PGS-Bildungsrate andererseits gefunden werden konnte, verstärkt allerdings die Forderung nach einem "PGA-by-pass".

Wie in der Methodik erwähnt wurde, wird die β -Ketosäure ebenfalls als PGS mitbestimmt. Normalerweise dürfte die Konzentration der β -Ketosäure zu niedrig sein, um einen meßbaren Einfluß auf die Gesamtkonzentration der PGS auszuüben. Unter besonderen Umständen, wie z. B. beim Übergang von Luft ohne CO_2 zu Luft mit CO_2 , überlagert sich die plötzliche Zunahme der β -Ketosäure wahrscheinlich der PGS-Zunahme aus der Glykolyse und führt zu einem besonders starken PGS-Anstieg.

Zur weiteren Klärung der Zusammenhänge wurden Giftversuche gemacht.

IV. Der Einfluß von Monojodessigsäure (MJE) auf die Zwischenstoffkonzentrationen bei Atmung und Photosynthese. (43)

Geht man von der Voraussetzung aus, daß bei der Photosynthese, in Umkehr zur Glykolyse, PGS durch die Triosephosphatdehydrogenase reduziert wird, so müßte Vergiftung der Photosynthese mit Monojodessigsäure (MJE), die ein starker Hemmstoff für dieses SH-Gruppen enthaltende Ferment ist, zu einer Anreicherung von PGS führen.

Versuche von Calvin und Mitarb. (11,12) mit MJE ($1,5 \cdot 10^{-4} \text{m}$) führten jedoch unerwarteterweise zu einer Abnahme an PGS und Zunahme an Zuckern. Eine Erklärung dafür brachten die Ergebnisse von Calo und Gibbs (13b), die zeigten, daß die Ribulose-5-phosphat-Kinase, die ebenfalls SH-Gruppen zu enthalten scheint (80), gegen MJE noch empfindlicher ist, als die DPN- bzw. TPN-abhängigen Triosephosphatdehydrogenasen (13b). In Übereinstimmung mit dieser Tatsache konnten Trebst und Mitarb. (72) bei Versuchen mit gebrochenen Chloroplasten und Verwendung von Ribose-5-phosphat als CO_2 -Akzeptor, bei einer MJE-Konzentration von 10^{-3}m eine 70 %ige Hemmung der CO_2 -Fixierung feststellen, während die gleiche MJE-Konzentration bei Verwendung von Ribulosediphosphat nur eine 24 %ige Hemmung verursachte. Erst 10^{-2}m MJE führte zu einer Anreicherung von PGS und Abnahme der Zuckerphosphate bei 36 %iger Hemmung der Gesamtfixierung.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen beobachteten Simonis und Weichart (69) bei Vergiftung von Elodea Blättern mit $4 \cdot 10^{-4} \text{m}$ MJE im Licht eine Zunahme von PGS und PEB und eine Abnahme der Zuckerphosphate (gemessen an der Aktivitätsverteilung von P^{32}). Daraus wurde gefolgert, daß der Angriffspunkt der MJE doch die Triosephosphatdehydrogenase ist.

Diese Ergebnisse von Simonis und Weichart konnten von Kandler und Mitarb. (43) mit Chlorella bestätigt werden. Wurde nach vorheriger Vergiftung der Algensuspension mit 10^{-4}m MJE markierte Glucose im Dunkeln gefüttert, so wurde der Aktivitätsanteil von PGS und PEB im Vergleich zur Kontrollprobe stark vermindert, während der der Fructose erheblich anstieg. Umgekehrt nahm der Aktivitätsanteil der PGS und des RuDP im Licht stark zu, während die Fructose eher eine Abnahme zeigte. Diese Ver-

suchsergebnisse sprechen also zunächst ebenfalls dafür, daß, genau wie bei der Atmung, die Hemmung der Triosephosphatdehydrogenase bei der Photosynthese der primäre Angriffspunkt der MJE ist. Andererseits konnte Kandler bei $C^{14}O_2$ -Fixierungen beobachten, daß die Photosynthese durch eine MJE-Konzentration von $10^{-6}m$ bereits zu 70 % und durch $10^{-5}m$ MJE bereits zu 98 % gehemmt wird, während weder Leeratmung noch Glucoseatmung durch diese Konzentrationen beeinflußt werden. Eine Hemmung der Atmung wurde erst durch MJE-Konzentrationen von $10^{-4}m$ und höher erreicht.

Es schien daher interessant, die Lokalisierung der MJE-Hemmung bei der Photosynthese durch Bestimmung der Zwischenstoffkonzentrationen zu untersuchen. Zunächst wurde der Einfluß der MJE auf die Atmung untersucht um festzustellen, ob die eventuell auftretenden Konzentrationsveränderungen mit der Verteilung der Radioaktivität nach Fütterung von markierter Glucose, unter MJE-Einfluß, vergleichbar sind.

a) Der Einfluß von Monojodessigsäure auf die Atmung.

Zum Vergleich der Einwirkung verschiedener MJE-Konzentrationen auf die endogene und auf die Glucose-Atmung, wurden Parallelproben einer mit Phosphatpuffer ($m/100$ Endkonzentration, $pH = 5,5$) versetzten Algensuspension ohne bzw. mit Glucose und der entsprechenden Giftmenge zwei Stunden unter Schütteln im Dunkeln inkubiert. Gleichzeitig wurde mit einem Teil der Algensuspension die Atmung, also der Sauerstoffverbrauch, unter den verschiedenen Bedingungen manometrisch gemessen.

Aus Tabelle 4 ist ersichtlich, daß sich starke Konzentrationsveränderungen ergeben, obwohl die Sauerstoffaufnahme dieser verarmten Algensuspension fast keine Hemmung (nur 10 %) zeigt. Es wurden also offenbar andere Substrate als Zucker veratmet. Auch bei der Glucoseatmung zeigt sich bereits eine geringe Verschiebung der Zwischenstoffkonzentrationen bei einer MJE-Konzentration, die noch keine Hemmung der Sauerstoffaufnahme bewirkt. Auffallend ist in Tabelle 4 und 5 die starke Anreicherung von FDP, das sonst nur in geringer Konzentration vorliegt. Durch die Hemmung der Triosephosphatdehydrogenase werden außerdem die Triosen angehäuft, während die jenseits der Blockierung

MJE-Konzentrat.	Leeratmung			
	Kontrolle	10^{-3}m	10^{-4}m	10^{-5}m
ATP	2,79	1,72	2,5	2,8
ADP	1,75	1,98	1,7	1,71
PGS	8,53	5,31	6,74	9,2
FDP	0,199	4,85	3,0	0,23
DAP + GAP	0,46	1,55	0,95	0,4
BTS	0,2	0,06	0,19	0,2
PEB	1,46	0,00	0,51	1,45
O_2 -Verbrauch (%)	100	90	98	100

Tabelle 4: Zwischenstoffkonzentrationen bei der Leeratmung nach 2-stündiger Inkubation mit verschiedenen MJE-Konzentrationen.

Werte $\cdot 10^{-4}\text{m}$. Gasphase: Luft; m/100 Phosphatpuffer pH = 5,5.

MJE-Konzentrat.	Glucose-Atmung			
	Kontrolle	10^{-3}m	10^{-4}m	10^{-5}m
ATP	1,55	0,49	1,9	1,55
ADP	1,63	0,72	1,47	1,52
PGS	6,86	5,07	5,2	6,5
FDP	0,34	7,5	4,92	1,3
DAP + GAP	0,84	2,04	2,3	0,98
BTS	0,38	0,00	0,2	0,2
PEB	0,32	0,069	0,07	0,32
O_2 -Verbrauch (%)	100	20	60	100

Tabelle 5: Zwischenstoffkonzentrationen bei der Glucoseatmung unter den gleichen Bedingungen wie in Tabelle 4.

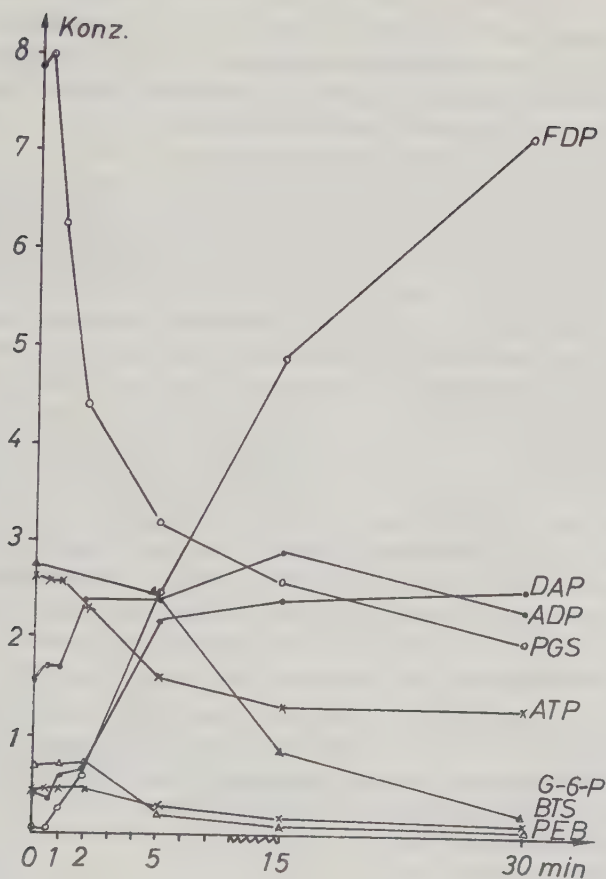


Abbildung 18: Der Einfluß von MJE auf die Zwischenstoffkonzentrationen bei der Atmung.

Nach einstündiger Glucoseatmung, Zugabe von MJE ($3 \cdot 10^{-4}$ m Endkonzentration) bei 0; Gasphase: Luft; m/30 Phosphatpuffer pH = 5,5; Konzentration $\cdot 10^{-4}$ m; 1 % Glucose.

liegende PGS und deren Folgeprodukte, PEB und BTS, abnehmen.

Um die Kinetik der Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen nach Zugabe von MJE im Dunkeln beobachten zu können, wurden die Algen vor der Giftzugabe eine Stunde lang mit Glucose (Endkonzentration 1 %) inkubiert, da die Glucoseatmung, wie aus Tabelle 5 ersichtlich, stärker gehemmt wird.

5 min nach Zugabe der MJE zeigt FDP bereits einen Anstieg auf das 50-fache des Ausgangswertes (Abbildung 18). Zur gleichen Zeit werden die Triosen auf das 5,5-fache vermehrt, während PGS, PEB und BTS abnehmen. Durch die Blockierung der Glykolyse und der damit verbundenen Verringerung der Atmungskettenphosphorylierung sinkt der ATP-Spiegel innerhalb von 5 min um 40 %, während die Konzentration an ADP um 50 % zunimmt.

Aus dieser Abnahme des ATP-Spiegels könnte man den Abfall der G-6-ph-Konzentration erklären. Ein Mangel an ATP bei der Hexokinasereaktion muß zu einer Abnahme des G-6-ph führen. Bedenkt man aber, daß gleichzeitig FDP in großen Mengen angereichert wird, so ergibt sich ein Widerspruch, da die Affinität der Hexokinase (Michaelis-Menten-Konstante: $5 \cdot 10^{-4}$) zu ATP größer ist als die Affinität der Fructose-6-ph-Kinase zu ATP (M.M.K.: $2,4 \cdot 10^{-3}$ m). Es wäre also erst eine Hemmung der FDP-Bildung und dann eine Abnahme der G-6-ph-Bildung zu erwarten.

Ein Vergleich der manometrischen Atmungsmessung nach MJE-Vergiftung mit den Konzentrationsveränderungen der Zwischenstoffe, zeigt die rasche Reaktion der letzteren. Während die Zwischenstoffe in den ersten Minuten die stärksten Konzentrationsschwankungen zeigen und nach 5 min bereits einem neuen konstanten Niveau zustreben (abgesehen von FDP, das nach 30 min eine 140-fache Anhäufung aufweist), setzt die Atmungshemmung erst nach 4 min ein. (Abbildung 19)

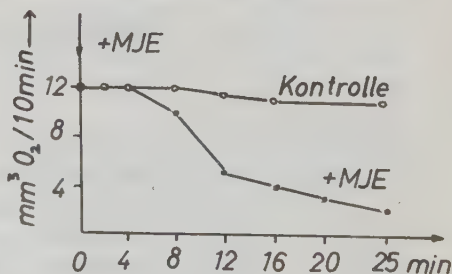


Abbildung 19:

Sauerstoffverbrauch nach Zugabe von $3 \cdot 10^{-4}$ m MJE. Messung an Parallelproben, der in Abbildung 18 benutzten Algensuspension.

b) Der Einfluß von MJE auf die Photosynthese. (Tabelle 6, Abbildung 20)

Die Tabelle 6 zeigt die Einwirkung verschiedener MJE-Konzentrationen auf die Zwischenstoffkonzentrationen während der Photosynthese. Parallele Proben einer Algensuspension wurden 15 min lang vorbelichtet und dann mit der entsprechenden Giftmenge 60 Minuten lang inkubiert. Im Gegensatz zu den starken Verschiebungen der Zwischenstoffkonzentrationen bei der Atmung nach MJE-Vergiftung, ist im Licht lediglich eine geringe Erhöhung des PGS-Spiegels zu beobachten.

Auch die Kinetik der Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen nach Zugabe von hohen MJE-Konzentrationen im Licht (Abbildung 20) zeigt, abgesehen von einem deutlichen PGS-Anstieg, nur relativ geringfügige Veränderungen; einen leichten Anstieg von PEB (nach 5 min) und von BTS und einen Abfall der DAP- und FDP-Konzentrationen.

Wie im folgenden Abschnitt näher ausgeführt wird, zeigt sich, daß die Lichtphosphorylierung nicht gehemmt wird. Auch Arnon und Mitarb. (2), Kandler (33) und Simonis und Mitarb. (67) konnten keine derartige Hemmung feststellen.

c) Übergang von Atmung zu Photosynthese unter MJE-Einfluß. (Abbildung 21)

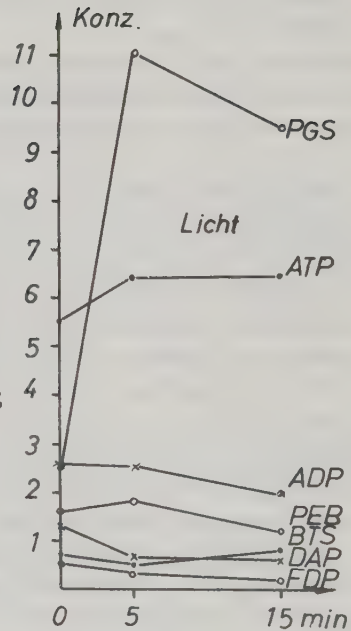
Nach einstündiger Glucoseinkubation im Dunkeln wurde MJE (10^{-3} m Endkonzentration) zugegeben und wie bei Abbildung 18 die Kinetik der Veränderungen der Substratkonzentrationen beobachtet. Nach 30 min erfolgte Belichtung und Entnahme weiterer Proben.

Die Abbildung 21 läßt nun besonders deutlich die Wirkung des Lichtes auf den durch MJE gehemmten Stoffwechsel erkennen. Die im Dunkeln extrem veränderten Verhältnisse der Zwischenstoffkonzentrationen werden durch Einschalten des Lichtes genau umgekehrt. Die Abnahme des angereicherten FDP im Licht entspricht fast stöchiometrisch der nun folgenden PGS-Zunahme. Auch der Anstieg der Triosen geht nach Einschalten des Lichtes sofort zurück. Da die Reduktion der PGS (bzw. ihres Vorläufers, der β -Ketosäure) zu Zuckern durch MJE blockiert ist, zeigt sich gleichzeitig mit der PGS-Zunahme ein Anreichern der PEB, und, zeit-

Abbildung 20:

Der Einfluß von MJE auf die Zwischenstoffkonzentrationen bei der Photosynthese.

Nach einstündiger Glucoseatmung und 15 min Vorbelichtung, Zugabe von MJE ($10^{-3}m$) bei 0; m/30 Phosphatpuffer, pH = 5,5; Luft + 0,5 % CO_2 ; Werte für PGS additiv um $14 \cdot 10^{-4}m$ vermindert. Konzentration $\cdot 10^{-4}m$.



Zwischenstoffe (Werte $\cdot 10^{-4}m$)	Kontrolle (75 min Licht)	Nach 15 min. Licht, 60min MJE im Licht		
		$10^{-4}m$	$3 \cdot 10^{-5}m$	$10^{-5}m$
ATP	5,10	5,14	4,94	5,40
ADP	3,78	3,77	3,76	3,76
PGS	22,9	26,30	25,20	25,00
FDP	0,72	0,78	0,755	0,755
DAP + GAP	1,44	1,64	1,44	1,51
BTS	0,94	1,28	0,82	0,82
PEB	1,87	1,79	1,85	1,71

Tabelle 6: Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen nach Zugabe verschiedener MJE-Konzentrationen im Licht.
Gasphase: Luft + 4 % CO_2 ; m/30 Phosphatpuffer pH = 5,5;
Werte $\cdot 10^{-4}m$

lich etwas verzögert, ein Anstieg der BTS. Es läßt sich daraus sehr schön die Reihenfolge der Zwischenstoffe innerhalb der Reaktionskette ablesen. Allmählich nimmt die PGS wieder ab, da sie über PEB abgebaut wird und FDP, nach Auslaufen des FDP-pools, nicht mehr nachgeliefert wird.

Die Bildung der PGS aus FDP im Licht erfolgt aber nicht über die Glykolyse, wobei eine Aufhebung der MJE-Hemmung vorausgesetzt werden müßte, sondern über RuDP. Diesen Zusammenhang kann man aus den Konzentrationsveränderungen in Abbildung 21 nicht ersehen, aber er läßt sich aus den Parallelversuchen mit markierter Glucose ableiten. (43) Durch Fütterung markierter Glukose konnte gezeigt werden, daß im Dunkeln praktisch kein RuDP gebildet wird, obwohl reichlich ATP vorhanden ist, wie die Bildung von FDP zeigt. Auf Grund der größeren Affinität zu ATP, verglichen mit der Affinität der Fructose-6-ph-Kinase zu ATP, hätte man eine Bildung von RuDP erwarten müssen. (Michaelis-Menten-Konstante für die Fructose-6-ph-Kinase: $2,4 \cdot 10^{-3}$; für die Ru-5-ph-Kinase: $2,8 \cdot 10^{-4}$)

Untersuchungen über die Aktivitätsverteilung lassen erkennen, daß beim Einschalten des Lichtes sofort RuDP gebildet wird, der FDP-Spiegel sinkt und PGS entsteht. Da die Reduktion der PGS, bzw. der β -Ketosäure, blockiert ist, reichert sich PGS an.

Die Bildung von RuDP kann aber nicht mit Hilfe der Ru-5-ph-Kinase vorsich gehen, da diese, nach dem Befund von Calo und Gibbs (13b) durch die verwendeten MJE-Konzentration bereits völlig gehemmt sein müßte. Die Bildung des RuDP ist also licht- aber nicht ATP-abhängig.

Man kann sich den Vorgang nur so erklären, daß das bei der Lichtphosphorylierung entstehende energiereiche Phosphat [$\sim \text{pH}$] nicht nur zur Bildung von ATP, sondern auch zur direkten Phosphorylierung von RuDP verwendet werden kann. Die beiden möglichen Wege sind in Abbildung 22 dargestellt.

Die Vorstellung einer direkten Übertragung des energiereichen Phosphates auf Ru-5-ph findet eine guten Stütze in den Versuchsergebnissen von Weichart (79), demzufolge RuDP, nach kurzfristiger Einlagerung von P^{32} im Licht, den größten Anteil der Radioaktivität enthielt, während ATP erst im Laufe der folgen-

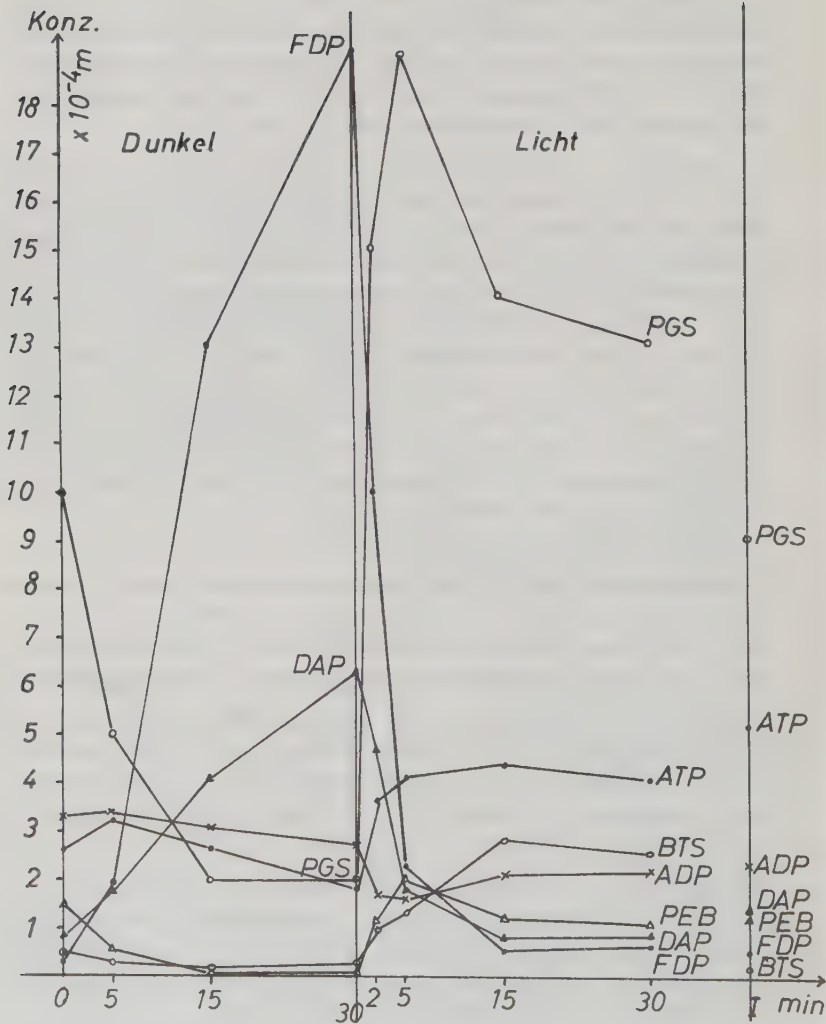


Abbildung 21: Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen beim Dunkel/Licht-Übergang unter MJE-Vergiftung. Nach einstündiger Glucoseatmung, im Dunkeln Zugabe von MJE (10^{-3} m) bei 0 und Übergang in Licht nach 30 min; I = Kontrollwerte nach 30 min Licht ohne MJE; PGS additiv um $8 \cdot 10^{-4}$ m vermindert; Konzentration $\cdot 10^{-4}$ m Gasphase: Luft+4 % CO ; m/30 Phosphatpuffer pH=5,5; 1 % Glucose.

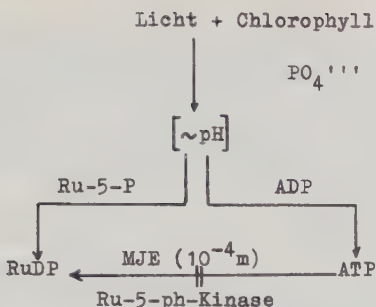


Abbildung 22: Schema für die Verwendung des im Licht gebildeten energiereichen Phosphates (43).

den Minuten, zusammen mit PGS und FDP, eine Zunahme zeigte. Wäre ATP das erste Produkt der Lichtphosphorylierung, so hätte es vor RuDP ein Maximum des Aktivitätsanteiles aufweisen müssen.

Auch die Tatsache, daß im Licht stationär weniger P³² in ATP eingelagert wird als im Dunkeln (24,68), gibt einen Hinweis auf die mögliche Umgehung des Adenylsäuresystems bei der Lichtphosphorylierung. Die Existenz eines nicht mit ATP identischen energiereichen Phosphates bei der Lichtphosphorylierung wurde bereits von Kahn und Jagendorf (29) durch Versuche mit isolierten Chloroplasten wahrscheinlich gemacht.

Die Änderungen der Zwischenstoffkonzentrationen (Anreicherung von PGS und geringe Aktivität in den Zuckerphosphaten), die durch die Einwirkung von MJE im Licht verursacht werden, lassen zunächst darauf schließen, daß auch bei der Photosynthese, wie bei der Atmung, primär die Triosephosphatdehydrogenase gehemmt wird, der Weg des Kohlenstoffes also über PGS zur Triose führt. Dagegen spricht aber, wie bereits erwähnt wurde, die wesentlich höhere Empfindlichkeit der Photosynthese gegenüber MJE im Vergleich zur Atmung. Auf Grund der Versuche muß man folgende Reihenfolge der Empfindlichkeit gegenüber MJE annehmen: Photosynthetische CO₂-Reduktion > Ru-5-ph-Kinase > Triosephosphatdehydrogenase.

Geht man von der Vorstellung eines "PGA-by-pass" aus, so wird die Reduktion der β -Ketosäure durch MJE gehemmt und die β -Ketosäure zu PGS hydrolysiert. Da die Bildung und Carboxylierung von RuDP ungehemmt weiterläuft, führt das zu einer wesentlichen Anreicherung der PGS und deren Folgeprodukte, PEB und BTS in der Zelle.

V. Der Einfluß von Arsenat auf die Zwischenstoffkonzentrationen bei Atmung und Photosynthese. (44)

Die Giftwirkung des Arsenates beruht, wie in der Einleitung angedeutet wurde, einerseits auf der Konkurrenz mit Orthophosphat und andererseits auf der Arsenolyse von Thioestern. In den Atmungsvorgang greift Arsenat durch Entkopplung ein, da es bei der Oxydation des Glyzerinaldehyd-3-phosphates das anorganische Phosphat ersetzen kann. Die auf diese Weise entstehende 1-Arseno-3-Phosphoglyzerinsäure ist, im Gegensatz zum Azyolphosphat, instabil und zerfällt in 3-PGS und Arsenat. Für die Abspaltung des Arsenat ist also kein Akzeptor nötig, während beim Übergang von 1,3-Diphosphoglyzerinsäure zu 3-PGS das abgespaltene Phosphat, unter Bildung von ATP, auf ADP übertragen wird. Bei Gegenwart von Arsenat entfällt also die Steuerung der Glykolysegeschwindigkeit durch die ADP-Konzentration und das anorganische Phosphat. Die Glykolyse kann ungehindert, bzw. mit erhöhter Geschwindigkeit ablaufen, aber die Energie dabei geht als Wärme verloren.

Bei der Umkehr der Glykolyse, die als Möglichkeit des Photosyntheseweges angesehen wird, hemmt Arsenat dadurch, daß es die 1,3-Diphosphoglyzerinsäure, in Gegenwart der Triosephosphatdehydrogenase, arsenolytisch spaltet und somit die reduktive Phosphorylierung der PGS verhindert. Bei ungehemmter Carboxylierung führt das zu einer PGS-Anreicherung. Außerdem ist zu erwarten, daß Arsenat auch bei der Lichtphosphorylierung durch Konkurrenz mit anorganischem Phosphat eine Hemmung verursacht.

Versuche von Trebst und Mitarb. (72) konnten die Arsenolyse des Thioesters bei der Umkehr der Glykolyse bestätigen. Wurde RuDP oder Ribose-5-phosphat als Akzeptor verwendet, so ergab sich in jedem Fall nur geringe Hemmung der Gesamtfixierung (14 -16 %

bei 10^{-3} m und 26 % bei 10^{-2} m Arsenat), aber eine starke Hemmung des Reduktionsschrittes. Dadurch wurde eine Anreicherung der Aktivität in der PGS und ein Fehlen der Radioaktivität in den Zuckern bewirkt. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu der Feststellung von Weißbach und Mitarb. (80), daß die Carboxydismutase durch Arsenat gehemmt wird. Allerdings konnte auch bei unseren Versuchen keine Hemmung der Carboxydismutase durch Arsenat beobachtet werden.

Im Gegensatz zu den Versuchsergebnissen von Trebst und Mitarb. (72) und Avron und Jagendorf (3), die keinen Hinweis auf eine Hemmung der Lichtphosphorylierung brachten, konnte Kandler (33) eine solche Hemmung durch Arsenat feststellen. Außerdem verursachte, bei neueren Versuchen von Kandler (44) mit Chlorella, bereits eine Konzentration von $6 \cdot 10^{-4} \text{ m}$ Arsenat eine 60 %ige Hemmung der Gesamtfixierung (gemessen an der Fixierung von C^{14}O_2). Bei diesen Versuchen zeigte der Aktivitätsanteil der PGS keine Zunahme sondern eine Abnahme, während der Radioaktivitätsanteil des FDP stieg. Da dies im Widerspruch zur Theorie der Hemmung des Reduktionsweges durch Arsenat steht, wurden auch in diesem Falle die Konzentrationsänderungen der Zwischenstoffe direkt gemessen.

Zur Auswahl der geeigneten Arsenatkonzentration wurden manometrische Atmungsmessungen durchgeführt. Die für die folgenden Versuche angewandten Arsenatkonzentrationen von $3 \cdot 10^{-3} \text{ m}$ führte zu der typischen Erhöhung der Leeratmung durch Entkopplung und der entsprechenden Hemmung der Glucoseatmung durch Mangel an ATP für die Hexokinase-Reaktion (Abbildung 23).

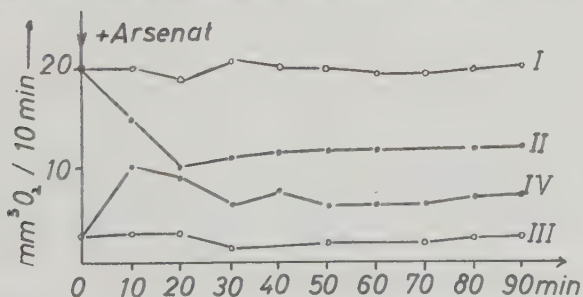


Abbildung 23: Sauerstoffverbrauch nach Zugabe von $3 \cdot 10^{-3} \text{ m}$ Arsenat.
 I = Glucoseatmung (Kontr.) III = Leeratmung (Kontr.)
 II = Glukoseatmung + Arsenat IV = Leeratmung + Arsenat

a) Übergang von Atmung zu Photosynthese nach Vorinkubation mit Arsenat. (Abbildung 24, Abbildung 25)

Die sorgfältig phosphatfrei gewaschene Algensuspension wurde 90 min im Dunkeln mit Arsenat inkubiert. Nach Entnahme der Ausgangsprobe wurde Licht eingeschaltet und wieder in den entsprechenden Zeitabständen Proben entnommen.

Abbildung 24 zeigt, daß sich die PGS beim Einschalten des Lichtes nicht anreichert, was auf eine Hemmung der Reduktion gedeutet hätte, sondern in den ersten Minuten sogar abnimmt. Im Gegensatz dazu nehmen FDP und die Triosen um das 2,5-fache zu und erreichen ein neues Niveau, das doppelt so hoch liegt wie im Dunkeln. Der ATP-Anstieg, der bei den MJE-Versuchen so besonders charakteristisch war, bleibt aus, was auf die Hemmung der Lichtphosphorylierung hinweist (33). Wurde die Algensuspension vor Arsenatzugabe 30 min lang mit Glucose inkubiert, so ergaben sich Konzentrationsveränderungen wie aus Abbildung 25 ersichtlich.

Wie man aus der manometrischen Atmungsmessung erkennen kann, wird nur die Leeratmung gefördert, bei gleichzeitiger Hemmung der Glucoseatmung. Die erhöhte Leeratmung beruht wahrscheinlich auf einer durch die Entkopplung geförderten Glykolyse. Die Hemmung der Glucoseatmung könnte man sich als Folge der Hemmung der Hexokinase-Reaktion durch ATP-Mangel erklären. Dagegen spricht aber die Anreicherung der BTS im Dunkeln bei der Leeratmung sowie bei der Glucoseatmung ($0,04/\mu\text{M}$ in Abbildung 24 bzw. $0,08/\mu\text{M}$ in Abbildung 25, gegenüber $0,005/\mu\text{M}$ in Abbildung 5b oder $0,01/\mu\text{M}$ in Abbildung 6). Danach hat es den Anschein, daß Arsenat nur die Glykolyse beschleunigt, während der oxydative Abbau der BTS, zumindest im Vergleich zum maximalen Durchsatz bei normaler Glucoseatmung, durch Arsenat gehemmt wird.

Wie auf Seite 46 ausgeführt wurde, bewirkt das Einsetzen der Lichtphosphorylierung einen Mangel an anorganischem Phosphat und kann auf diese Weise, durch kompetitive Hemmung, eine Abnahme der PGS-Konzentration verursachen. Da die Triosephosphat-oxydation in Gegenwart von Arsenat aber weitgehend unabhängig von Phosphat ist, zeigt die PGS-Konzentration beim Einschalten des Lichtes nur eine geringe Abnahme.

Die BTS-Konzentration nimmt im Licht noch mehr zu. Vermutlich führt die CO_2 -Fixierung, die durch die angewandte Arsenatkon-

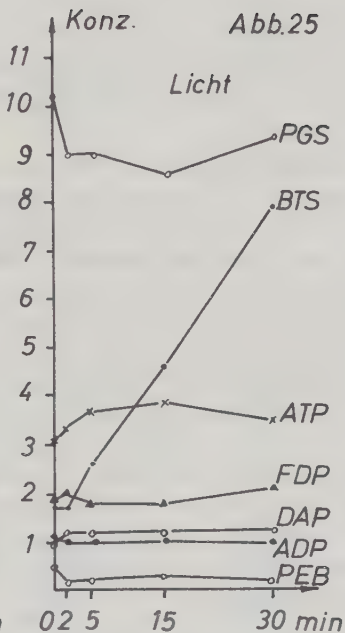
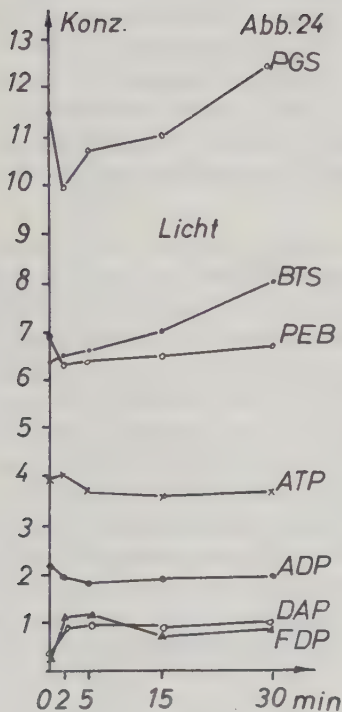


Abbildung 24: Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen beim Dunkel/Licht-Übergang nach 90 min Vorinkubation mit $3 \cdot 10^{-3}$ m Arsenat. ADP additiv um $1 \cdot 10^{-4}$ m vermehrt; PEB und BTS um $6 \cdot 10^{-4}$ m vermehrt. Konzentration $\cdot 10^{-4}$ m; Gasphase: Luft + 0,5 % CO_2 ; pH = 5,5.

Abbildung 25: Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen beim Dunkel/Licht-Übergang nach 90 min Vorinkubation mit $3 \cdot 10^{-3}$ m Arsenat und 30 min Vorinkubation mit Glucose (1 %). Konzentration $\cdot 10^{-4}$ m; Gasphase: Luft + 0,5 % CO_2 ; pH = 5,5.

zentration nur zu 60 % gehemmt ist (72), unter Umgehung der PGS, zu einer besseren Substratversorgung für die Glykolyse ohne entsprechende Durchsatzsteigerung der BTS-Oxydation. Bei gleichzeitiger Glucosefütterung arsenatvergifteter Zellen führt Belichtung zu einer noch stärkeren Anreicherung von BTS. Der Grund dafür dürfte in der nun noch günstigeren Substratversorgung der Glykolyse durch die verstärkte Glucoseassimilation mit Hilfe der nicht völlig gehemmten Lichtphosphorylierung sein.

Man könnte nun andererseits auch sagen, daß die Anreicherung von BTS im Licht nur deshalb zustande kommt, weil die Reduktion der PGS (in Umkehr der Glykolyse) durch Arsenat gehemmt ist und daher, bei fortschreitender Carboxylierung, der Abbau über PEB und BTS erfolgt. Dieses Argument läßt sich aber schwer aufrecht erhalten, wenn man die parallel ausgeführten C^{14} -Versuche von Kandler (44) berücksichtigt. Das unter Arsenatvergiftung neu assimilierte $C^{14}O_2$ müßte in Form von BTS bzw. deren Derivate (Alanin und organische Säuren) auftreten. Das ist aber nicht der Fall. Es zeigt sich vielmehr bei gleichzeitiger Aktivitätsabnahme der PGS eine deutliche Anreicherung der Aktivität in den Zuckern. Die Reduktion ist also nicht begrenzend und die Zunahme der BTS-Konzentration läßt sich nur durch geförderten Abbau von nicht oder nur schwach markierten Reservenzuckern erklären.

b) Zugabe von Arsenat während der Photosynthese. (Abbildung 26)

Nach einer Vorbelichtung der Algensuspension von 15 min wurde eine Probe entnommen und in einem parallelgeschalteten Lollipop weiter belichtet; diese Probe ergab dann die Kontrollwerte (Abbildung 26, I). Von der Gesamtsuspension wurden einige ml zur Bestimmung der Ausgangswerte entnommen und extrahiert und dann in den Rest der Suspension Arsenat eingespritzt.

In gleicher Weise wie schon beim Dunkel/Licht-Übergang beobachtet wurde, führt die Hemmung der Atmung bei entkoppelter Gärung im Licht zu einem starken BTS-Anstau, während PEB durch gute ADP-Versorgung eine Abnahme zeigt. Ansich sollte man auf Grund der Entkopplung eine kurzfristige PGS-Zunahme erwarten, aber es ist möglich, daß vorausgegangene Induktionsschwankun-

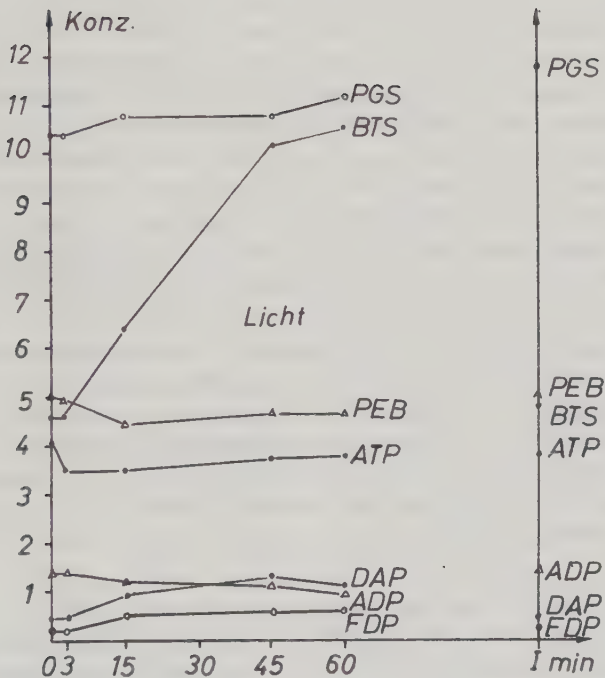


Abbildung 26: Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen durch Zugabe von $3 \cdot 10^{-3} \text{m}$ Arsenat im Licht. Zugabe von Arsenat bei 0 nach 15 min Photosynthese; I = Kontrollwerte nach 75 min Belichtung ohne Arsenat; PGS additiv um $3 \cdot 10^{-4} \text{m}$ vermindert; PEB und BTS additiv um $4 \cdot 10^{-4} \text{m}$ vermehrt; Konzentration $\cdot 10^{-4} \text{m}$; pH = 5,5; Gasphase: Luft + 0,5 % CO_2 .

gen nicht erfaßt wurden, da die erste Probe nach 3 min entnommen wurde.

Aus Abbildung 26 ist ersichtlich, daß die Triosen und FDP angereichert werden. Das steht zunächst im Widerspruch zu der Annahme, daß die Glykolyse durch Arsenat entkoppelt und somit gefördert wird. FDP und die Triosen sind aber auch Ausgangssubstrate für die Bildung des RuDP. Wird die Lichtphosphorylierung und damit die Bildung des RuDP durch Arsenat gehemmt, so wird FDP angereichert. Bei den Parallelversuchen mit C^{14} fand Kandler (44) einen erhöhten Anteil der Radioaktivität in FDP bei gleichzeitiger Abnahme der Aktivität im RuDP. Diese Anreicherung von Triosen und FDP überlagert sich also dem Effekt, der auf Grund der entkoppelten Glykolyse zu erwarten war.

Vergleicht man nun die Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen mit den Versuchsergebnissen von Trebst und Mitarb. (72) und Kandler (44), so ergibt sich eine wesentlich bessere Übereinstimmung mit den Versuchen von Kandler, da keine PGS-Zunahme beobachtet werden konnte. Allerdings ist die Abnahme der PGS-Konzentration, sofern sie überhaupt erfolgte, wesentlich geringer als die Abnahme des Aktivitätsanteils der PGS bei Kanders Versuchen mit $C^{14}O_2$.

Diese Diskrepanz erklärt sich zwanglos unter der Annahme eines "PGA-by-pass". Durch Mangel an RuDP wird die Carboxylierung zum begrenzenden Faktor der Photosynthese. Wird der Reduktionsvorgang nicht gehemmt, dann führt das zu einer Verminderung der β -Ketosäure-Konzentration. Da die Gesamtmenge an β -Ketosäure gegenüber der Gesamtmenge der PGS (mit der sie ja gemeinsam bestimmt wird) ohnehin sehr klein ist, machen sich Konzentrationsschwankungen nicht bemerkbar. Bei Versuchen mit C^{14} tritt dagegen die Verminderung des β -Ketosäure-pools als Verminderung des Aktivitätsanteiles der PGS sehr deutlich in Erscheinung, da im wesentlichen nur die aus der β -Ketosäure entstehende PGS markiert ist.

Der Unterschied zwischen der Wirkung von Arsenat auf die CO_2 -Fixierung bei gebrochenen Chloroplasten, wo der Hauptanteil der Radioaktivität in PGS angereichert wird, und der Wirkung auf die Photosynthese bei Chlorella, wo weder der Aktivitätsanteil noch die Gesamtmenge der PGS zunimmt, läßt sich durch

folgende Annahme verstehen: Die Photosynthese der gebrochenen Chloroplasten erfolgt im Licht, bei geringer CO_2 -Fixierungsrate, durch Umkehr der Glykolyse, während für die Photosynthese in ganzen Zellen eine Umgehung der PGS angenommen werden muß (s. Abbildung 1).

Der primäre Angriffspunkt des Arsenats liegt in diesem Fall nicht bei der Reduktion des fixierten Kohlenstoffes, sondern bei der Bildung des RuDP mit Hilfe der Lichtphosphorylierung.

VI. Der Einfluß von 2,4-Dinitrophenol (DNP) auf die Zwischenstoffkonzentrationen bei Atmung und Photosynthese. (44)

Im Gegensatz zu Arsenat ist DNP ein typischer Entkoppler der Atmungskettenphosphorylierung und hat auf die Substratphosphorylierung keinen hemmenden, sondern eher fördernden Einfluß. (49). Durch Entkopplung der Elektronenübertragungen von Phosphorylierungen bei der Atmungskette wird kein ATP gebildet und es steht daher der Glykolyse mehr ADP und anorganisches Phosphat zur Verfügung. DNP hebt somit den Pasteureffekt bei Hefe auf; trotz gleichbleibender oder erhöhter Atmung, erhöht sich auch die Glykolyse auf den anaeroben Wert.

Auch als Photosynthesegift ist DNP bekannt (2,21,26,27,82), aber die Lichtphosphorylierung ist weniger empfindlich als die Atmungskettenphosphorylierung (33). 10^{-6}m DNP hemmt, nach Versuchen von Simonis und Urbach (71), bereits die Atmungskettenphosphorylierung ohne auf die Lichtphosphorylierung einen Einfluß zu haben. Versuche von Kandler (39) zeigten, daß DNP-Konzentrationen, die die Atmung bereits deutlich entkoppeln, noch keine Hemmung der CO_2 -Fixierung bewirkten. Diese Tatsache verursachte Zweifel an der Forderung für die Beteiligung von ATP an der photosynthetischen Reduktion. Nach Bassham und Calvin (6) werden 3 Mol ATP zur Reduktion von 1 Mol CO_2 gebraucht. Ist die Reduktion von der ATP-Konzentration abhängig, so sollte Vergiftung mit hoher DNP-Konzentration, bei der die Atmungskettenphosphorylierung und die Lichtphosphorylierung gehemmt werden, zur Blockierung der Reduktion und damit zur Anreicherung von PGS führen.

Versuche dieser Art wurden von Trebst und Mitarb. (72) mit gebrochenen Chloroplasten und Ribose-5-phosphat oder RuDP als CO_2 -Akzeptor durchgeführt. Es zeigte sich in jedem Fall eine deutliche PGS-Zunahme. Bei den Versuchen mit Ribose-5-phosphat war die Gesamtfixierung wesentlich stärker gehemmt, da zur Bildung von RuDP ebenfalls ATPnötig ist. Eine deutliche Verschiebung des Aktivitätsanteiles zu gunsten der PGS, ergab sich bei den Versuchen von Trebst und Mitarb. (72) nur bei hohen DNP-Konzentrationen (10^{-3}m , $2 \cdot 10^{-2}\text{m}$). 10^{-4} DNP führte nur zu 3 %iger Hemmung der Gesamtfixierung.

Zu gegenteiligen Ergebnissen gelangte jedoch Kandler (44) bei Versuchen mit Chlorella. Die C^{14}O_2 -Fixierung wurde in Gegenwart von 10^{-4}m bzw. $2 \cdot 10^{-4}\text{m}$ bereits zu 50- bis 60 % gehemmt, aber es wurde keine PGS-Anreicherung sondern eher eine

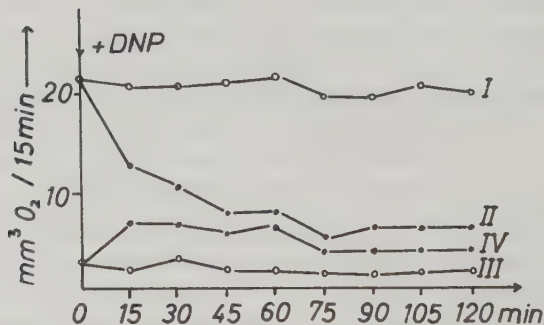


Abbildung 27: Sauerstoffverbrauch nach Zugabe von 10^{-4}m DNP.

- I = Glukoseatmung (Kontrolle)
- II = Glukoseatmung + DNP
- III = Leeratmung (Kontrolle)
- IV = Leeratmung + DNP

Abnahme beobachtet. Da auch der Prozentgehalt an RuDP niedriger war, konnte daraus gefolgert werden, daß in ganzen Zellen durch DNP nicht der Reduktionsschritt sondern, wie bei Arsenatvergiftung, die Bildung des CO_2 -Akzeptors gehemmt wird. Die Be-

stimmung der Zwischenstoffkonzentrationen sollte diese Versuche ergänzen.

Die Vergiftung der Algen erfolgte mit einer DNP-Konzentration von 10^{-4} m. Bei dieser Konzentration wird die Lichtphosphorylierung bereits gehemmt (2,39,71). Die Atmungsmessung ergab bei dieser Konzentration noch eine geringe Erhöhung der Leeratmung bei gleichzeitiger starker Hemmung der Glucoseatmung (Abbildung 27). Da die Wirkung des DNP sehr pH-abhängig ist (49), wurden die Algen in Phosphatpuffer pH 5,5 (m/100 Endkonzentration) suspendiert.

a, Übergang von Atmung zu Photosynthese unter DNP-Einfluß.
(Abbildungen 28 und 29)

Zugabe von DNP (10^{-4} m Endkonzentration) im Dunkeln bewirkt eine Abnahme von PGS und PEB, während die BTS stark zunimmt. Offensichtlich beschleunigt DNP die Dephosphorylierung der PEB und beseitigt somit den Engpaß an dieser Stufe der Glykolyse. Dabei erfolgt weder die Oxydation der BTS noch die Glykolyse mit gleichhoher Geschwindigkeit. Die später einsetzende Förderung der Glykolyse bewirkt eine allmähliche Zunahme der PGS. Da die BTS weiterhin ansteigt, bleibt die Beschleunigung der oxydativen Phosphorylierung anscheinend hinter der Glykolysegeschwindigkeit zurück.

Die Abnahme des ATP um 75 % nach Zugabe von DNP im Dunkeln ist das deutliche Zeichen für die Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung. Im Laufe von 30 min steigt der ATP-Spiegel allerdings wieder um 25 %. Beim Einschalten des Lichtes zeigt sich nicht der übliche Anstieg, da auch die Lichtphosphorylierung gehemmt ist; erst nach 15 min hat die Konzentration wieder merklich zugenommen. Die FDP- und Triose-Konzentrationen verändern sich im Dunkeln wenig, aber 30 min nach Einschalten des Lichtes haben die Triosen den doppelten und FDP den 3-fachen Wert erreicht.

Die besonders starken Konzentrationsveränderungen der BTS geben wieder einen Hinweis auf die Phosphatregulation, wie sie auf Seite 46 diskutiert wurde. Die Entkopplung der Atmung durch DNP beruht, wie bereits gesagt, auf der Entkopplung der Atmungs-

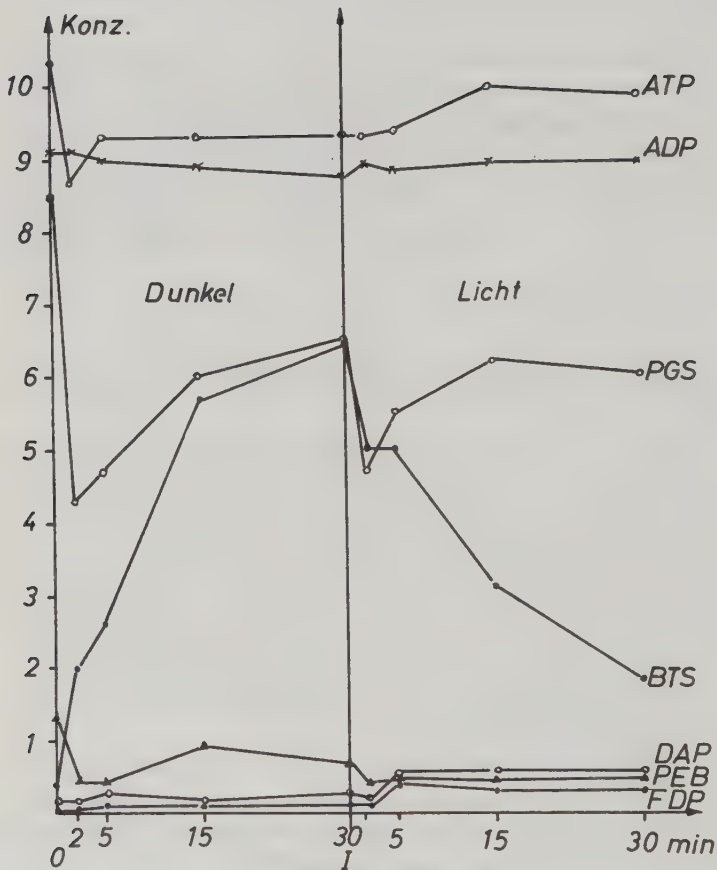


Abbildung 28: Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen beim Dunkel/Licht-Übergang unter DNP-Vergiftung. Zugabe von 10^{-4} m DNP bei 0 im Dunkeln; nach 30 min Übergang in Licht (I); ADP und ATP additiv um $8 \cdot 10^{-4}$ m vermehrt; Konzentration $\cdot 10^{-4}$ m; Gasphase: Luft + 0,5 % CO_2 ; m/100 Phosphatpuffer, pH = 5,5.

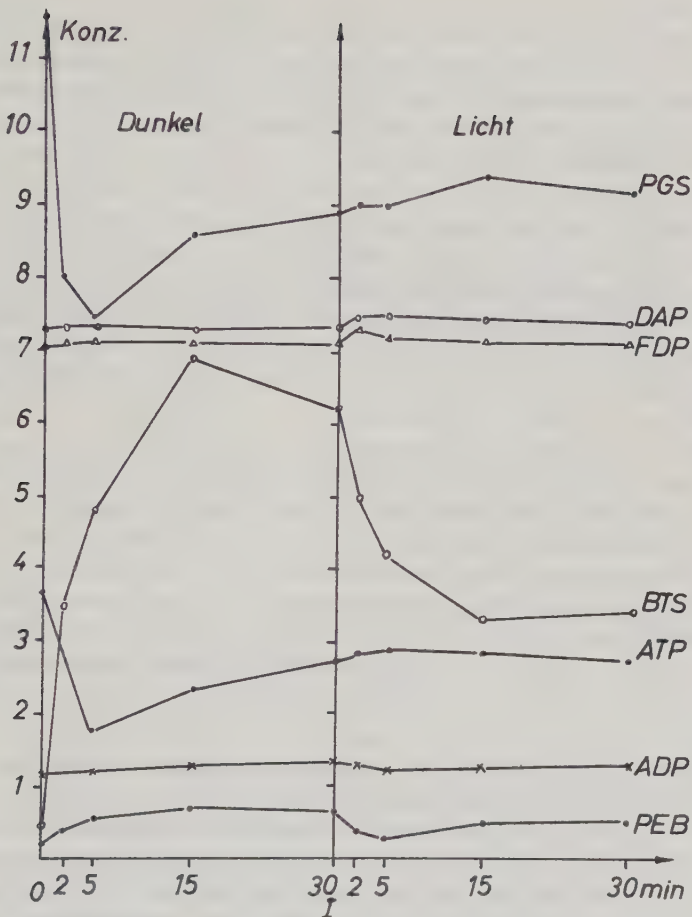


Abbildung:29: Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen beim Dunkel/Licht-Übergang unter DNP-Vergiftung, nach 30 min Vorinkubation mit Glucose (1 %). Zugabe von 10^{-4} m DNP bei 0 im Dunkeln; nach 30 min Übergang in Licht (I); PGS additiv um $1 \cdot 10^{-4}$ m vermindert; DAP und FDP additiv um $7 \cdot 10^{-4}$ m vermehrt; Konzentration $\cdot 10^{-4}$ m; Gasphase: Luft + 0,5 % CO_2 ; m/100 Phosphatpuffer, pH = 5,5.

kettenphosphorylierung. Eine erhöhte Abbaurrate über den Zitronensäure-Cyclus läßt daher in der Induktionszeit eine Abnahme der Zwischenstoffe der Glykolyse erwarten. Wie aus Abbildung 28 und 29 ersichtlich ist, beseitigt das vermehrte Angebot an ADP den Engpaß an der PEB, und PGS und PEB zeigen eine deutliche Abnahme. Der Abbau erfolgt schneller als die Bildung durch Glykolyse.

Der manometrischen Atmungsmessung (Abbildung 27) entsprechend wird die Leeratmung durch 10^{-4} M DNP nur wenig erhöht, während die Glucoseatmung stark gehemmt ist. Diese DNP-Konzentration führt also bei maximaler Substratversorgung nicht zur Förderung sondern zur Hemmung der Atmung. Aus den Versuchen von Kandler (39) geht hervor, daß bei 10^{-4} M DNP die maximale Förderung überschritten ist und eine Hemmung der Leeratmung durch eine noch unbekannte Wirkung des DNP einsetzt. Man kann aus den Atmungsmessungen (Abbildung 27) schließen, daß in erster Linie nur eine Förderung der Glykolyse vorliegt. Dementsprechend zeigt sich bei der Bestimmung der Zwischenstoffkonzentrationen eine BTS-Anreicherung (Abbildungen 28, 29), die stärker ist als bei Gegenwart von Arsenat (Abbildungen 24, 25). Durch vorherige Glucosefütterung kann man diesen Anstieg der BTS-Konzentration noch verstärken. Im weiteren Verlauf wird durch die BTS-Zunahme ein Rückstau verursacht, der sich in der Zunahme von PEB und PGS zeigt.

Einschalten des Lichtes in Abbildung 28 bewirkt wieder eine Abnahme an PGS und gleichzeitig eine Abnahme der BTS-Konzentration. Diese Abnahme der BTS erscheint unverständlich (verglichen mit dem BTS-Anstau in Gegenwart von Arsenat) ist aber wieder durch die Rückkopplung über das Phosphat zu erklären. Einschalten des Lichtes führt zu Mangel an anorganischem Phosphat. Es zeigt sich allerdings in diesem Fall keine starke Zunahme der ATP-Konzentration, aber durch Einschalten des Lichtes wird Phosphat wieder vermehrt in Zuckermono- und -diphosphate (einschließlich RuDP) eingelagert. Damit wird die fördernde Wirkung, die DNP auf die Glykolyse ausübt, wenigstens zum Teil aufgehoben, die BTS kann wieder schneller verbraucht werden als sie gebildet wird. Es ist offensichtlich, daß eine Hemmung der Atmung durch Licht nicht primär durch Mangel an oxydierter Liponsäure verursacht wird (6), denn sonst müßte die hohe BTS-

Konzentration zumindest erhalten, wenn nicht noch mehr erhöht werden.

Es ergeben sich also gegensätzliche Konzentrationsverschiebungen, verglichen mit den Arsenatversuchen (Abbildungen 24,25,26). In Gegenwart von Arsenat kann die Glykolyse nicht durch die Lichtphosphorylierung gehemmt werden, da das Arsenat das anorganische Phosphat ersetzt, in diesem Fall hemmt das Licht nur die Atmungskettenphosphorylierung. Umgekehrt wird bei Gegenwart von DNP im Licht die Glykolyse durch Phosphatmangel gehemmt, während das Licht die Atmungskette nicht hemmen kann, da diese durch ^{die}elektronenübertragende Fähigkeit des DNP (soweit keine weiteren Hemmung vorliegt) unabhängig von Phosphatübertragungen geworden ist.

b) Zugabe von DNP während der Photosynthese.(Abbildung 30)

Die Algensuspension wurde 15 min lang vorbelichtet, daraufhin eine Probe entnommen und in einem parallelgeschalteten Lollipop weiter belichtet; diese Probe ergab dann die Kontrollwerte (Abbildung 30 I). Von der Gesamtsuspension wurde ein Teil zur Bestimmung der Ausgangswerte entnommen und extrahiert. Die restliche Suspension wurde mit DNP versetzt,

Die Konzentrationsveränderungen lassen sich wieder auf die gleichen Ursachen zurückführen, Durch erhöhtes Angebot an ADP wird der Engpaß an der PEB überwunden und die PEB-Konzentration nimmt ab. Die Geschwindigkeit dieser Reaktion ist wieder höher als die Förderung der Glykolyse und der Atmung. sodaß es zu einer Abnahme der PGS-Konzentration und einer kurzfristigen Zunahme der BTS-Konzentration kommt. Da aber im Licht durch die Lichtphosphorylierung die anorganische Phosphatkonzentration niedriger liegt als im Dunkeln, ist die Förderung der Glykolyse geringer und die Umsatzrate der Glykolyse überschreitet nicht die Geschwindigkeit des oxydativen BTS-Abbaues. Die BTS-Anreicherung geht also nach wenigen Minuten wieder zurück.

Ähnlich wie bei den Arsenatversuchen (Abbildung 26) zeigt FDP eine deutliche Zunahme. Wie die entsprechenden Versuche von Kandler (44) ergeben, beruht auch hier die Erhöhung auf der Hemmung der Lichtphosphorylierung, die sich durch einen geringeren

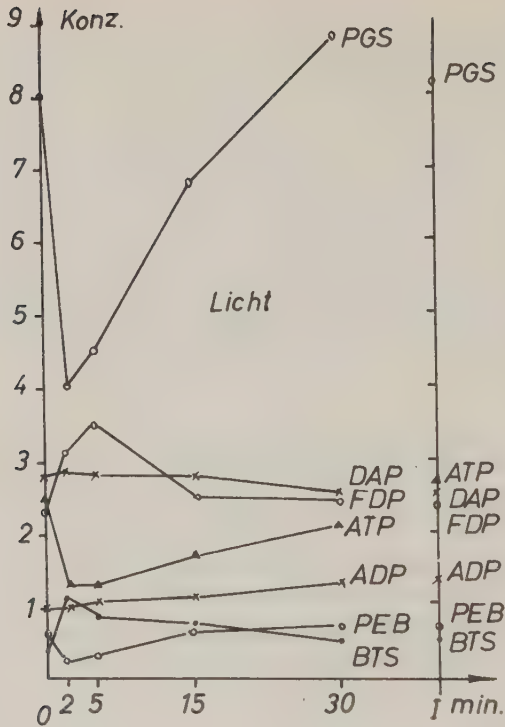


Abbildung 30: Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen durch Zugabe von 10^{-4} m DNP im Licht. Zugabe von DNP bei 0 nach 15 min Photosynthese; I = Kontrollwerte nach 45 min Belichtung ohne DNP; DAP und FDP additiv um $2 \cdot 10^{-4}$ m vermehrt; Konzentration $\cdot 10^{-4}$ m; Gasphase: Luft + 0,5 % CO_2 ; m/100 Phosphatpuffer, pH = 5,5.

Aktivitätsanteil des RuDP bemerkbar macht (s. S. 64). In Übereinstimmung mit den Versuchen von Kandler kann auch bei DNP-Vergiftung keine PGS-Anreicherung, wie bei den MJE-Versuchen, beobachtet werden. Die Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen lassen sich durch die Phosphat-Regulation der Glykolyse erklären und stehen offenbar nur durch die Konkurrenz mit Lichtphosphorylierung um das anorganische Phosphat mit den Photosynthesereaktionen in Beziehung.

Als Angriffspunkt der Hemmung der Photosynthese durch DNP ergibt sich somit nur die Hemmung der Lichtphosphorylierung und damit Hemmung der Bildung des CO_2 -Akzeptors, wie Kandler aus den Versuchen mit C^{14} folgerte. Auf Grund der Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen ersieht man aber auch, daß die Lichtphosphorylierung weniger gehemmt wird als die Atmung.

VII. Der Einfluß von Cyanid auf die Zwischenstoffkonzentrationen bei Atmung und Photosynthese.

Im Vergleich zu den Giften, die in den vorausgehenden Kapiteln beschrieben wurden, zeigt die Blausäure eine wesentlich vielseitigere Hemmwirkung. Durch Komplexbildung mit dem Eisen des Atmungsfermentes wird die Atmungskette und damit der Zitronensäure-Cyklus und die oxydative Phosphorylierung blockiert. Eine kräftige Hemmwirkung wird bei Chlorella offenbar erst durch hohe Cyanidkonzentrationen erreicht, wie der unterschiedliche BTS-Anstau bei Abbildungen 32 und 33 zeigt. Warburg (76) fand, daß eine Cyanidkonzentration von mindestens 10^{-1}m nötig ist, um die endogene Atmung bei Chlorella auf die Hälfte zu reduzieren, während Glukoseatmung und CO_2 -Assimilation bereits durch 10^{-4}m bzw. $4 \cdot 10^{-4}\text{m}$ zur Hälfte gehemmt werden. Bei einer Konzentration von $\text{m}/10$ Cyanid wird außerdem die Glykolyse gehemmt. Das DPN-Blausäure-Addukt verhindert die Wasserstoffübertragung, die Aldolase wird gehemmt und außerdem spielen Cyanhydrinbildungen eine bedeutende Rolle (50); im Fall der Glykolyse werden die Triosen abgefangen (48).

Schmidt und Mitarb. (64,65) hatten bei ihren Arbeiten zur Aufklärung der Konfiguration der Hamamelonsäure diese durch Cyanhydrinsynthese aus RuDP hergestellt und dabei auf die besondere Reak-

tivität der Pentosen hingewiesen. Das Vorhandensein von Hamamelonsäurediphosphat in Chlorellaextrakten wurde erstmals von Kandler (38,41) beschrieben und ebenso die Abhängigkeit des Verhältnisses von RuDP zu Hamamelonsäure von den Extraktionsbedingungen. Daraus schloß Kandler (38), daß auch bei Chlorella die Bildung der Hamamelonsäure durch Cyanhydrinsynthese erfolgt. Einen direkten Nachweis konnten dann Rabin und Mitarb. (59) durch Anwendung von $KC^{14}N$ erbringen.

Bei der Hemmung der Atmung durch hohe Cyanidkonzentrationen sollte man also auf Grund dieser Voraussetzungen folgende Konzentrationsänderungen der Zwischenstoffe erwarten: Abnahme an ATP, Zunahme an ADP und Zunahme von BTS durch Hemmung des Zitronensäure-Cyklus. Abnahme von PEB wegen der guten ADP-Versorgung, Anhäufen der Triosen durch Abfangen als Cyanhydrine, Anstau von FDP durch Aldolase-Hemmung und demzufolge Abnahme von PGS.

Gibt man Cyanid im Licht zu, so sind einerseits die gleichen Hemmwirkungen wie im Dunkeln zu erwarten, aber andererseits kommt noch die Hemmung der Carboxydismutase hinzu. Kornberg und Mitarb. (46) fanden in vitro eine totale Hemmung bei $10^{-2}m$ KCN, Trebst und Mitarb. (72) mit gebrochenen Chloroplasten bereits bei $10^{-3}m$ KCN eine 95 %ige Hemmung. Diese Hemmung der Carboxydismutase wird dann bei hohen Cyanidkonzentrationen noch durch das Abfangen des RuDP als Cyanhydrin unterstützt.

Andererseits ist bekannt, daß die Hillreaktion, also die Schaffung eines Reduktanden, sowie die Lichtphosphorylierung nicht, oder nur wenig cyanidempfindlich sind (22,32,34,37,38,72). Erfolgt die Photosynthese im Licht in Umkehr der Glykolyse, so ist auch die Hemmung der Hexosesynthese durch Abfangen der Triosen als Cyanhydrine bzw. durch die Hemmung der Aldolase zu erwarten.

Im Licht sind die Zusammenhänge also wesentlich komplizierter, aber es läßt sich doch einiges voraussagen. Die Konzentration der PGS sollte mehr abnehmen als im Dunkeln und die Triosen eine starke Zunahme zeigen. Außerdem kann man eine Anreicherung von RuDP erwarten, falls genügend energiereiches Phosphat vorhanden ist. Im übrigen sollte, wie im Dunkeln, eine Zunahme der BTS, Abnahme von PEB, Abnahme von ATP und Zunahme von ADP erfolgen. Abgesehen von Phosphatbestimmungen, die Kandler (32,33,34)

bei cyanidvergifteten Algen machte, geben nur die Versuche von Kandler (41) mit $C^{14}O_2$ eine Vorstellung von der möglichen Verschiebung der Zwischenstoffkonzentrationen nach KCN-Vergiftung bei Chlorella. Daher wurde der Verlauf der Zwischenstoffkonzentrationen nach KCN-Zugabe im Dunkeln sowie im Licht untersucht und mit den Veränderungen der Aktivitätsgerteilung nach $C^{14}O_2$ -Fixierung und KCN-Vergiftung verglichen.

Die Vergiftung erfolgte mit m/100 bis m/10-KCN-Endkonzentration. Die Algensuspension wurde in jedem Fall auf pH 4,8 eingestellt und vor KCN-Zugabe 30 min mit Glukose inkubiert. Bei hoher Cyanidkonzentration (m/10) wurde das KCN in der Injektionsspritze durch Aufsaugen der entsprechenden Menge Salzsäure neutralisiert und sofort in die Algensuspension eingespritzt. Häufiges Umschütteln der TES-sauren Extrakte vor dem Neutralisieren genügte, um überschüssiges Cyanid soweit zu entfernen, daß die enzymatischen Tests nicht gehemmt wurden.

a) Der Einfluß von Cyanid auf die Zwischenstoffkonzentrationen bei der Atmung.

Die Abbildungen 31,32,33 zeigen die Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen nach Zugabe von drei verschiedenen KCN-Konzentrationen im Dunkeln. Die Hemmung der Atmung durch Cyanid macht sich durch die Abnahme von ATP und Zunahme von ADP und außerdem durch die Anreicherung von BTS bemerkbar. Im dem Maße wie ADP durch Dephosphorylierung frei wird und nicht mehr von der Atmungskettenphosphorylierung verbraucht wird, kann die PEB vermehrt zu BTS umgewandelt werden. Da bei dieser Reaktion normalerweise das ADP den begrenzenden Faktor darstellt, sinkt die Konzentration der PEB nach KCN-Zugabe ab. Der kurze Anstieg von PGS in den ersten 10 sec beruht wahrscheinlich auf einem Rückstau durch die Atmungshemmung. Die Abnahme der PGS wird erst etwas stärker mit zunehmender Hemmung der Aldolase. Abbildung 34 zeigt als Beispiel die Hemmwirkung von KCN auf Muskel-Aldolase.

Die Zunahme der Triosen (Abbildung 33) durch m/10 KCN kann durch zwei Ursachen bedingt sein. Erstens werden die Triosephosphate durch Cyanhydrinbildung abgefangen und dadurch angehäuft, zwei-

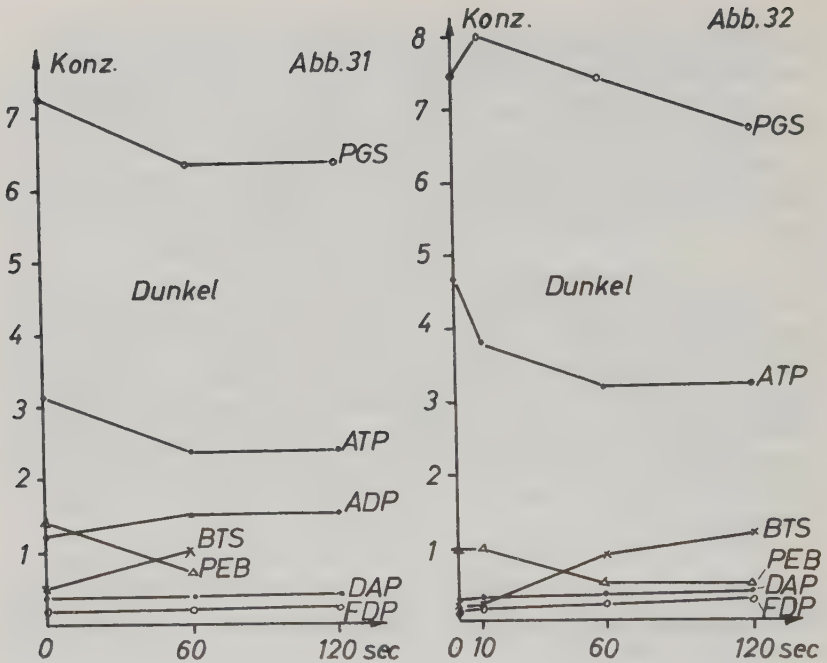


Abbildung 31: Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen Durch Zugabe von $m/50$ KCN im Dunkeln. KCN-Zugabe bei 0; nach 30 min Vorinkubation mit Glucose (1 %); PGS additiv um $3 \cdot 10^{-4} m$ vermindert; Konzentration $\cdot 10^{-4} m$; Gasphase: Luft; pH = 4,8.

Abbildung 32: Veränderung der Zwischenstoffkonzentrationen durch Zugabe von $m/20$ KCN im Dunkeln. KCN-Zugabe bei 0, nach 30 min Vorinkubation mit Glucose (1 %); Konzentration $\cdot 10^{-4} m$; Gasphase: Luft; pH = 4,8.

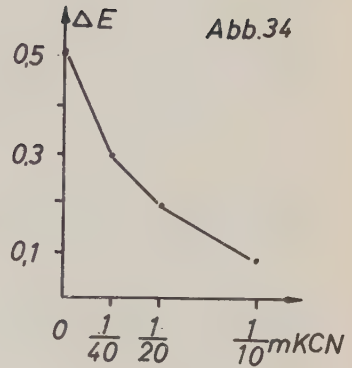
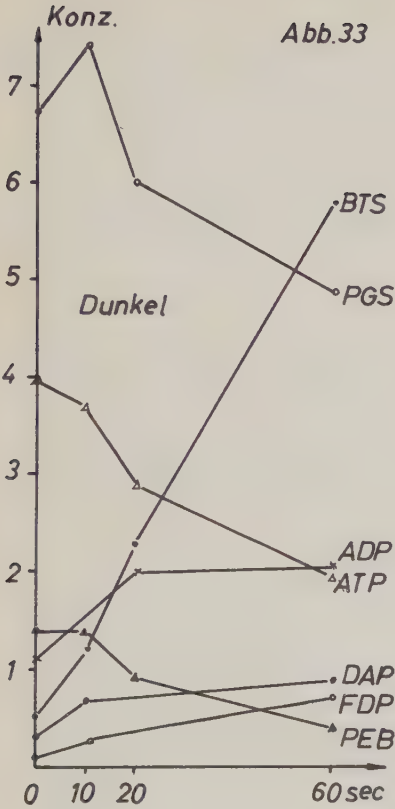


Abbildung 33: Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen durch Zugabe von $m/10$ KCN im Dunkeln. KCN-Zugabe bei 0, nach 30 min Vorinkubation mit Glucose (1 %); PGS additiv um $5 \cdot 10^{-4}m$ vermindert; Konzentration $\cdot 10^{-4}m$; Gasphase: Luft; pH = 4,8.

Abbildung 34: Hemmung der Aldolase durch KCN, gemessen mit Hilfe des "optischen Testes" (s. S. 16).

tens besteht die Möglichkeit einer Hemmung der Wasserstoffübertragung durch Anlagerung von Blausäure an DPN^+ . Ein Vergleich mit entsprechenden Versuchen bei Hefe, die Lynen (50) ausführte, zeigt, daß hier FDP nur vorübergehend zunimmt, während die Triosephosphate wesentlich stärker angereichert werden als bei Chlorella. Daraus läßt sich schließen, daß bei der Hefe die Glykolysehemmung im wesentlichen durch Abfangen der Triosephosphate als Cyanhydrine und eventuell durch Mangel an DPN^+ erfolgt, während bei Chlorella anscheinend die Hemmung der Aldolase überwiegt, was sich in einer anhaltenden FDP-Anreicherung und nur mäßigen Zunahme der Triosen äußert.

b) Der Einfluß von Cyanid auf die Zwischenstoffkonzentrationen bei der Photosynthese (im "steady-state").

Um den Einfluß von Cyanid auf die Zwischenstoffe im Licht zu untersuchen, wurde, parallel zu den entsprechenden Dunkelversuchen, ein Teil der jeweiligen Algensuspension ($\text{pH} = 4,8$) 30 min im Dunkeln mit Glucose inkubiert und nach 10 min Belichtung unter Luft + CO_2 -Begasung mit KCN versetzt.

Im Gegensatz zu den Versuchen im Dunkeln zeigt die PGS-Konzentration in den ersten Sekunden nach KCN-Zugabe eine kurzfristige Abnahme, der aber sofort wieder eine Zunahme folgt. Im weiteren Verlauf sinkt die PGS-Konzentration ähnlich wie im Dunkeln langsam ab. Aus dieser Kinetik läßt sich schließen, daß die Carboxylierung am stärksten gehemmt wird, wodurch eine sofortige Abnahme der an der Photosynthese beteiligten PGS (bzw. β -Ketosäure) erfolgt. Als nächstes wird der BTS-Abbau gehemmt, was bei den Dunkelversuchen einen sofortigen Anstieg der PGS, und im Licht die Zunahme der PGS nach 10 sec bewirkt. Die später einsetzende Hemmung der Glykolyse durch die Aldolasehemmung führt dann im Dunkeln wie im Licht zu allmählicher Abnahme der PGS. Die Triosen nehmen etwas stärker zu als im Dunkeln, aber PGS-Abnahme und DAP-Zunahme entsprechen sich weder zeitlich noch im absoluten Ausmaß.

Die Zunahme des FDP ist im Licht nicht so stark wie im Dunkeln, dafür wird ein anderes Diphosphat, und zwar RuDP, stark angereichert. Wie bereits erwähnt (s. S. 36) ist RuDP mit unserer

Methodik normalerweise nicht nachweisbar, sondern nur wenn es auf Grund von CO_2 -Mangel angereichert wird. Da die Carboxylierungsreaktion, wie oben angeführt, die cyanidempfindlichste Reaktion ist, muß Cyanidzugabe die gleichen Folgen haben, wie CO_2 -Entzug, Da das RuDP in gleicher Weise wie die Triosen kein Halbazetal bilden kann und somit eine freie, reaktionsfähige Aldehydgruppe hat, kann es durch Cyanid als Cyanhydrin abgefangen und angereichert werden (64,65). Wie im nächsten Abschnitt ausgeführt wird, wird ein Teil des Cyanhydrins durch Verseifen zu Hamamelonsäure umgewandelt.

ATP nimmt auch im Licht nach KCN-Zugabe kräftig ab. Dies steht im Widerspruch zu den früheren Untersuchungen von Kandler (32), bei denen festgestellt wurde, daß die Konzentration des anorganischen Phosphates bei Cyanidvergiftung im Licht, im Gegensatz zu Dunkel-Versuchen, nicht zunimmt. Da außerdem die Glucoseaufnahme cyanidvergifteter Algen im Licht wesentlich weniger gehemmt ist als im Dunkeln, nahm Kandler (33) an, daß die Lichtphosphorylierung weitgehend KCN-unempfindlich ist.

Eine Erklärung für das Fehlen einer Zunahme der anorganischen Phosphatkonzentration bei gleichzeitiger Abnahme der ATP-Konzentration läßt sich auf der Basis der bereits im Zusammenhang mit den MJE-Versuchen diskutierten Möglichkeit einer Umgehung des Adenylsäuresystems bei der Lichtphosphorylierung geben (Abbildung 22). Demnach wird durch Cyanid im Licht wie im Dunkeln die oxydative Phosphorylierung unterbunden, was zu einer Abnahme der ATP-Konzentration führt. Das freiwerdende anorganische Phosphat wird nun im Licht durch eine weitgehend cyanidunempfindliche Lichtphosphorylierung sofort in energiereiches Phosphat [$\sim\text{pH}$] umgewandelt und, ohne Beteiligung des Adenylsäuresystems, zur Bildung von RuDP verwendet. Da RuDP in großen Mengen angereichert wird, ist der normale Phosphatkreislauf gestört, und es kommt nicht zum Freisetzen von anorganischem Phosphat.

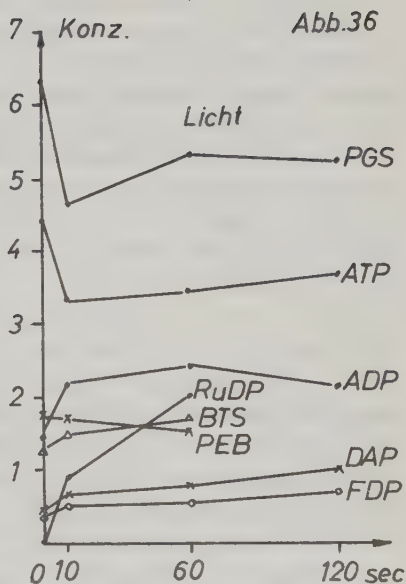
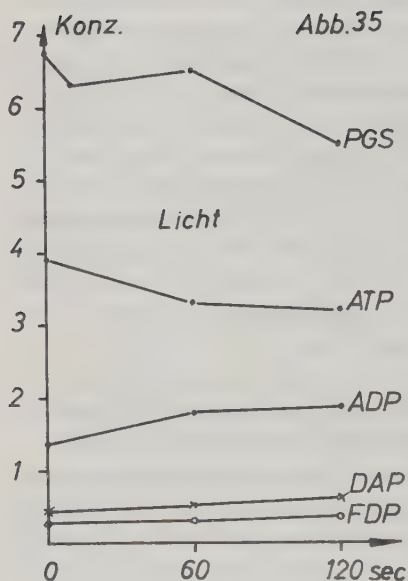


Abbildung 35: Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen durch Zugabe von $m/50$ KCN im Licht.
KCN-Zugabe bei 0, nach 30 min Vorinkubation mit Glucose (1 %) im Dunkeln und 10 min Belichtung, Konzentration $\cdot 10^{-4}m$; Gasphase: Luft + 0,5 % CO_2 ; pH = 4,8.

Abbildung 36: Veränderung der Zwischenstoffkonzentrationen durch Zugabe von $m/20$ KCN im Licht.
KCN-Zugabe bei 0, nach 30 min Vorinkubation mit Glucose (1 %) im Dunkeln, 10 min Belichtung; PEB und BTS additiv um $1 \cdot 10^{-4}m$ vermehrt; Konzentration $\cdot 10^{-4}m$; Gasphase: Luft + 0,5 % CO_2 ; pH = 4,8.

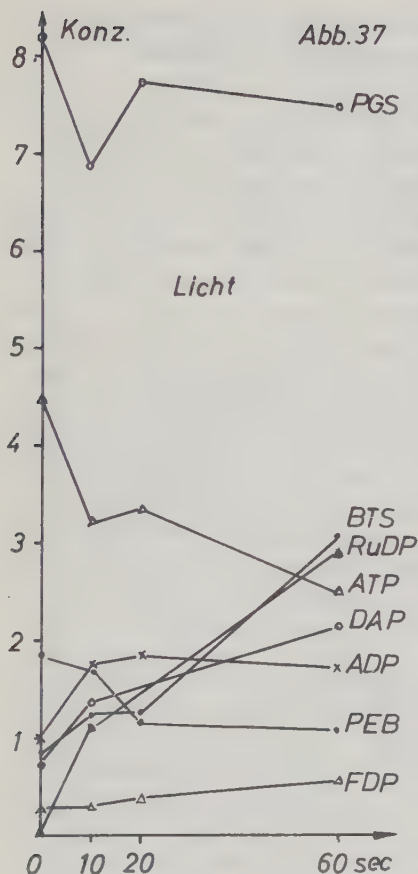


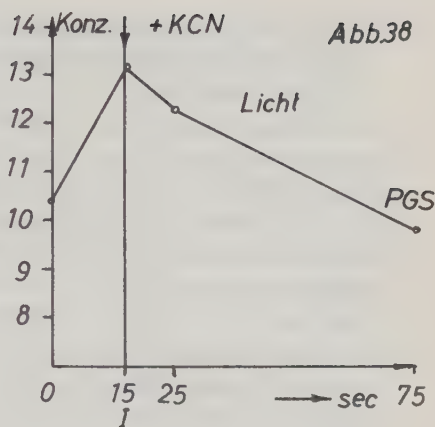
Abbildung 37: Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen durch Zugabe von $m/10$ KCN im Licht.

KCN-Zugabe bei 0, nach 30 min Vorinkubation mit Glucose (1 %); Konzentration $\cdot 10^{-4}m$; Gasphase: Luft + 0,5 % CO_2 ; pH = 4,8.

Abbildung 38: Veränderung der PGS-Konzentration im Licht durch Zugabe von KCN nach kurzfristiger CO_2 -Fixierung.

5 min Vorbelichtung unter Luft-Begasung ohne CO_2 .

Bei 0 Zugabe von $NaHCO_3$, nach 15 sec bei I Zugabe von $m/30$ KCN; $m/400$ KH_2PO_4 ; pH = 4,8; Konzentrat. $\cdot 10^{-4}m$



c) Der Einfluß von Cyanid auf die Photosynthese, gemessen an der Verteilung der Radioaktivität nach kurzfristiger $C^{14}O_2$ -Fixierung.

Der geringe Unterschied zwischen den Veränderungen der PGS-Konzentration nach Zugabe von KCN im Licht und im Dunkeln, steht im Widerspruch zu den Versuchen von Kandler (41) mit $C^{14}O_2$, bei denen der Aktivitätsanteil der PGS im Licht, 10 sec nach Cyanidzugabe, um 80 % abnahm. Aus diesem Grund wurden entsprechende Versuche mit $C^{14}O_2$ wiederholt und mit enzymatischen pool-Bestimmungen parallelisiert.

Für diese Versuche wurde eine 7 %ige Algensuspension verwendet. Die Suspension enthielt KH_2PO_4 in einer Endkonzentration von m/400 und wurde vor Versuchsbeginn auf pH 4,8 eingestellt. Die Suspension wurde 5 min lang im Lollipop unter Durchströmen von CO_2 -freier Luft vorbelichtet, daraufhin der Luftstrom unterbrochen und $NaHC^{14}O_2$ eingespritzt. Nach 15 sec wurde die Ausgangsprobe entnommen, die übrige Suspension mit KCN (m/30) vergiftet und in den folgenden Sekunden weitere Proben entnommen. Dabei wurde die Belichtung entweder fortgesetzt oder es wurde gleichzeitig mit der KCN-Zugabe verdunkelt.

Bei diesen Versuchen befinden sich die Zwischenstoffkonzentrationen nicht im stationären Fließgleichgewicht, sondern in der Induktionsphase, die auf die Zugabe von CO_2 zu einer CO_2 -verarmten Suspension folgt (s. S. 39). Diese Inkonstanz wurde in Kauf genommen, da der Hauptzweck der Versuche darin bestand, durch die sehr kurze Einlagerung von C^{14} möglichst nur die Photosynthese-pools innerhalb des Chloroplasten zu markieren.

Die Tabellen 7 und 8 zeigen die Veränderungen in der prozentualen Verteilung der Aktivität, wie sie bei derartigen Versuchen stattfinden. Um den direkten Vergleich mit den vorangegangenen Versuchen über die Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen zu ermöglichen, wurden unter denselben Bedingungen mit einem Teil der gleichen Algensuspension Parallelversuche gemacht, bei denen, nach Zugabe von inaktivem $NaHCO_3$, die Kinetik der PGS durch den Fermenttest beobachtet wurde. Die Ergebnisse sind bei den Tabellen 7 und 8 und in Abbildung 38 angeführt.

Tabelle 7 zeigt die Verteilung der Radioaktivität nach Cyanid-

vergiftung bei weiterer Belichtung. Spalte 1 (Kontrolle) enthält die übliche Verteilung der Radioaktivität nach kurzfristiger Photosynthese. Ungefähr die Hälfte der Aktivität befindet sich in der PGS, wenige Prozent in den Säuren und der Rest in Zuckern. Fügt man nun KCN zu, so wird die Fixierung gestoppt (41), die Gesamtfixierung bleibt also praktisch gleich, und die weitere Belichtung unter KCN-Einfluß kann nur noch Veränderungen der bereits markierten Zwischenstoffe hervorrufen.

Der auffälligste Effekt im Licht ist die rasche Abnahme der PGS. 3 sec nach KCN-Zugabe enthält sie nur noch 7 % und nach 15 sec nur noch 2 % der Gesamtaktivität. Demgegenüber nimmt zunächst der Aktivitätsanteil der Mono- und Diphosphate und später auch der Aminosäuren, besonders des Alanin zu. Dephosphorylierung der Mono- und Diphosphate zeigte, daß es sich ausschließlich um eine Anreicherung von RuDP und Hamamelonsäure handelt, entsprechend den Versuchen von Kandler (41). Da die Lichtphosphorylierung nicht cyanidempfindlich ist, wird im Licht RuDP gebildet, das als Cyanhydrinverbindung abgefangen wird. Je nach den Extraktionsbedingungen tritt nun entweder Verseifung zu Hamamelonsäure ein, oder die Cyanhydrinbindung wird wieder, unter Freisetzen von RuDP, gespalten. (38). Daraus erklären sich auch die Schwankungen der Hamamelonsäurekonzentration. Auch Zuckerphosphate, wie Glucose, Heptose und Triosen, werden in den ersten Sekunden angereichert. Der Aktivitätsanteil geht dann aber wieder zurück, da sie vermutlich in RuDP und Polysaccharid umgewandelt werden.

Im weiteren Verlauf des Versuches nehmen allmählich die Aminosäuren (besonders Alanin) an Aktivität zu. Vermutlich wird ein Teil des in den ersten Sekunden zu Zuckern reduzierten C^{14} über die Glykolyse zu Brenztraubensäure abgebaut und wegen der Hemmung des aeroben Abbaues durch KCN, in Alanin festgelegt. Dies entspricht der BTS-Zunahme bei den Versuchen zur Bestimmung der Zwischenstoffkonzentrationen (Abbildung 37).

Wird gleichzeitig mit der Vergiftung verdunkelt (Tabelle 8), so nimmt der Aktivitätsanteil der PGS erst nach 15 bis 20 sec deutlich ab und beträgt nach einer Minute noch 15 % der Gesamtaktivität. Der Anteil der Diphosphate bleibt etwa auf gleicher Höhe, während der Anteil der Monophosphate langsam zurückgeht.

Substrat	Kontrolle 15 sec in $C^{14}O_2$	Nach 15 sec PS^x) mit $C^{14}O_2$, Zugabe von m/30 KCN; nach KCN-Zugabe PS in $C^{14}O_2$						
		3 sec	15 sec	25 sec	40 sec	60 sec	90 sec	3 min
Unlöslich (Polysacch.)	2,5	3,5	3,5	3,5	4,5	5,0	4,7	6,0
Diphosphate	10,0	24,0	30,5	40,0	38,0	33,0	40,3	39,0
Zucker-Mono- phosphate	30,0	46,5	41,0	30,0	27,0	26,0	18,0	19,0
UDPG ^{xx})	1,0	1,5	2,0	3,5	3,0	5,0	5,5	4,5
PGS	49,0	7,0	2,0	1,0	1,0	2,0	1,5	1,5
PEB	1,0	0,5	0,1	1,2	1,2	1,3	0,7	0,4
Aminosäuren	5,0	15,0	18,5	18,0	21,9	24,1	25,3	25,6
(davon Alanin)	(3,6)	(7,8)	(14,5)	(13,5)	(15,0)	(20,6)	(19,7)	(23,0)
organische Säuren	1,5	2,0	2,4	2,8	3,4	3,6	4,0	4,0
Zucker	43,5	75,5	77,0	77,0	72,5	69,0	68,5	68,5
Säuren	56,5	24,5	23,0	23,0	27,5	31,0	31,5	31,5
PGS · 10 ⁻⁴ m (enzymat. a) bestimmt b)	8,2	—	8,0	6,1	6,8	—	—	—
	13,1	—	12,3	—	—	9,8	—	—

Tabelle 7: Verteilung der Radioaktivität in % der Gesamtfixierung bei Cyanidvergiftung einer 7 %igen Algensuspension im Licht.

Vor Bicarbonatzugabe 5 min Licht in CO_2 -freier Luft.

Giftzugabe nach 15 sec $C^{14}O_2$ -Fixierung.

pH = 4,8; m/400 KH_2PO_4 ; m/30 KCN.

PS^x) = Photosynthese; UDPG^{xx}) = Uridindiphosphoglucose.

Substrat	Kontrolle 15 sec PS ind $C^{14}O_2$	Nach 15 sec PS mit $C^{14}O_2$, Zugabe von m/30 KCN und Ausschalten des Lichtes.					
		5 sec	15 sec	25sec	45 sec	65sec	2 min
Unlöslich (Polysacch.,)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Diphosphate	8,0	7,8	7,0	7,7	7,8	7,5	8,4
Zucker-Mo- no-phos.	32,0	27,0	29,0	26,0	24,8	24,5	19,0
UDPG	1,0	1,6	2,5	3,8	3,4	3,0	2,6
PGS	51,0	48,2	43,3	29,7	24,0	15,7	7,2
PEB	1,5	2,8	1,3	1,2	0,8	1,0	0,5
Aminosäuren	4,5	10,0	14,8	29,1	36,8	45,7	59,3
(davon Alanin)	(1,8)	(7,2)	(12,3)	(19,6)	(33,8)	(42,6)	(54,6)
org. Säuren	1,0	1,0	1,1	1,5	1,4	1,6	2,0
Zucker	42,0	38,0	39,5	38,5	37,0	36,0	31,0
Säuren	58,0	62,0	60,5	61,5	63,5	64,0	69,0
PGS · 10 ⁻⁴ m (enzym. a) bestimmt)	8,5	—	9,0	10,8	—	9,5	—

Tabelle 8: Verteilung der Radioaktivität in % der Gesamtfixierung bei Cyanidvergiftung einer 7 %igen Algensuspension, beim Übergang von Licht in Dunkel.

Vor Bicarbonatzugabe 5 min Licht in CO_2 -freier Luft. Giftzugabe und gleichzeitiges Verdunkeln nach 15 sec $C^{14}O_2$ -Fixierung.

pH = 4,8; m/400 KH_2PO_4 ; m/30 KCN.

Auch die Polysaccharide zeigen, im Gegensatz zu dem Versuch im Licht, keine Zunahme der Aktivität. Dagegen erhöht sich der Aktivitätsanteil des Alanin noch drastischer als im Licht. Es ist offensichtlich, daß die radioaktive PGS zu Alanin umgewandelt wird. Dazu kommt dann noch eine Anreicherung der Aktivität im Alanin durch langsamen Abbau der Zuckerphosphate. Auch die Versuche von Calvin und Mitarb.(11) zeigten eine deutliche Anreicherung der Aktivität im Alanin.

Demzufolge verlagert sich bei gleichzeitigem Verdunkeln nach KCN-Zugabe der Schwerpunkt der Aktivitätsverteilung zu gunsten der Bildung von Säuren (besonders Alanin), während im Licht nach KCN-Zugabe der höhere Aktivitätsanteil den Zuckerphosphaten (Pentosen und Hamamelonsäure) zukommt. In Tabelle 7 und 8 wurde jeweils die Summe aller Zucker der Summe aller Säuren gegenübergestellt.

Im ganzen gesehen, stehen die Ergebnisse in sehr guter Übereinstimmung mit den entsprechenden Versuchsergebnissen von Kandler(41).

Vergleicht man die Kinetik der prozentualen Verteilung der Radioaktivität mit der Kinetik der Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen, so fällt die Diskrepanz im Verhalten der PGS auf.

Verdunkelt man die Algensuspension gleichzeitig mit der KCN-Zugabe, so zeigt der Aktivitätsgehalt der PGS eine schwache Abnahme, während die Gesamtkonzentration leicht zunimmt. Diese Zunahme der PGS könnte sowohl als Rückstau durch die Hemmung der BTS-Oxydation aufgefaßt werden, als auch als Rest der starken PGS-Anreicherung nach Verdunklung unter normalen Bedingungen. Die Quelle der PGS kann auf keinen Fall eine weitere Carboxylierung von RuDP sein, da in diesem Fall nicht nur die Gesamtfixierung sondern auch der Aktivitätsanteil der PGS zu und nicht abnehmen dürfte. Man muß daher, wie im Falle der Verdunklung unter normalen Bedingungen, annehmen, daß die PGS aus der nicht vollständig gehemmten Glykolyse stammt, die bekanntlich im Plasma abläuft, dessen Zuckerreservoir nach der nur 15 sec dauernden Photosynthese in $C^{14}O_2$ noch nicht, oder jedenfalls wesentlich schwächer, markiert ist als die Zwischenstoffe des Photosynthese-Cyclus im Chloroplasten.

Um das allmähliche Abwandern der Radioaktivität zum Alanin zu verstehen, kann man annehmen, daß die in den Chloroplasten befindliche markierte PGS, bzw. deren Vorläufer, bei fehlender Reduktionskraft nach Ausschalten des Lichtes im Chloroplasten selbst zu BTS abgebaut wird. Setzt man voraus, daß die Menge an Zwischenstoffen im Chloroplasten sehr gering ist im Vergleich zu der Menge im Plasma und nur ein geringer Stoffaustausch stattfindet, so ist das unterschiedliche Verhalten von Radioaktivitätsanteil einerseits und Gesamt-pool andererseits verständlich. Aber auch wenn sich die im Chloroplasten lokalisierte markierte PGS im Laufe der Versuchsdauer mit dem Plasma-pool mischt, könnte es zu dem gleichen Phänomen kommen. Bei nur teilweiser Hemmung der Glykolyse erfolgt weiterhin ein Abbau unmarkierter Verbindungen aus den Zuckerreserven, der die PGS-Konzentration ziemlich konstant hält. In diesen Abbau wird die markierte PGS mit einbezogen, wobei durch die Verdünnung mit unmarkierter PGS eine starke Abnahme der spezifischen Aktivität erfolgt. Da aber andererseits der BTS-Abbau stärker gehemmt wird als die Glykolyse, ergibt sich an der Stufe der BTS wieder eine Anreicherung der Aktivität, die in der Zunahme des Aktivitätsanteils des Alanin zum Ausdruck kommt.

Wird nun andererseits auch noch nach KCN-Zugabe weiter belichtet, so enthält die PGS nach wenigen Sekunden praktisch keine Radioaktivität mehr, während die Gesamtkonzentration nur allmählich abnimmt. Offensichtlich wird die photosynthetische Reduktion der PGS, bzw. deren Vorläufer, zunächst durch KCN nicht gehemmt. Wie unveröffentlichte Versuche von Kandler ergaben, tritt eine Hemmung auch dann nicht ein, wenn die Algen vor der Belichtung für längere Zeit (bis zu 1 min) mit KCN inkubiert werden. Bemerkenswert ist, daß eine Anreicherung von Triosephosphat auch in den ersten Sekunden, wenn der größte Teil der radioaktiven PGS verschwindet, nicht beobachtet werden kann. Eine nennenswerte Zunahme der Gesamtkonzentration der Triosen (Abbildung 37) erfolgt erst zwischen 10 und 60 sec, wenn die Gesamtkonzentration der PGS langsam absinkt. Dies entspricht den Beobachtungen im Dunkeln, bei denen sich die Zwischenstoffe auf Grund der Glykolysehemmung ähnlich verhalten.

Man muß daher annehmen, daß auch der relativ langsam erfolgen-

de Triosephosphat-Anstieg im Licht nicht nur durch Anreicherung photosynthetisch reduzierter PGS, sondern durch Hemmung der Glykolyse eintritt und aus inaktiven Zuckern des Plasma-pools stammt.

Wenn man mit Calvin annimmt, daß die PGS ein echtes Zwischenprodukt der Photosynthese ist, so ist das gegensätzliche Verhalten von markierter PGS und Gesamtkonzentration unverständlich und nur so zu erklären, daß zwei getrennte "PGS-pools" vorliegen, von denen der im Chloroplasten radioaktiv markierte so klein ist, daß er an der Gesamtmenge der PGS keine Änderungen hervorruft. Außerdem müßte der Austausch zwischen Plasma und Chloroplasten so gering sein, daß selbst nach völliger Reduktion der PGS im Chloroplasten, nichts nachdiffundiert und reduziert wird, was eine Änderung der Gesamtkonzentration zur Folge hätte.

Dagegen spricht aber die Überlegung (siehe Seite 43), daß auf Grund der Vorstellung von Calvin der PGS-Anteil des Chloroplasten mindestens so groß sein muß wie die Abnahme der PGS-Gesamtkonzentration nach Einschalten des Lichtes, oder daß zwischen Plasma und Chloroplasten ein guter Austausch stattfinden muß. Bestünde eine ausgeprägte Trennung zwischen Chloroplast und Plasma, so müßte die Abnahme der PGS in den ersten Sekunden nach KCN-Zugabe im Licht, wie beim Dunkel/Licht-Übergang, ca. 50 % (Abbildung 5) und nicht nur ca. 15 % (Abbildung 37) betragen. Nimmt man andererseits an, daß ein guter Austausch von Substraten innerhalb der Zelle vorliegt, so sollte, nach Reduktion der markierten PGS innerhalb des Chloroplasten im Laufe der Zeit außerdem PGS aus dem Plasma in den Chloroplasten diffundieren, dort reduziert werden und eine noch kräftigere Abnahme der PGS-Gesamtkonzentration bewirken.

Zahlreiche Versuche sprechen für einen raschen Austausch von Substraten innerhalb der Zelle:

1. Die Aufrechterhaltung der Ungleichverteilung der Aktivität in Glukose bei der Photosynthese in $C^{14}O_2$ und gleichzeitiger Fütterung inaktiver Glukose (23).
2. Die Tatsache, daß nach Photosynthese in $C^{14}O_2$ nach Verdunkeln die Radioaktivität sofort in Säuren des Zitronensäure-Cyklus erscheint (6), wobei ein Austausch vom Chloroplasten

zum Plasma und zu den Mitochondrien vorliegen muß;

3. Versuche von Porter und Mitarb.(57) mit Blättern und Kandler (31) mit Chlorella zeigen, daß Glucose auch unter anaeroben Bedingungen zu Polysaccharid aufgebaut werden kann, was nur möglich ist, wenn die Glucose aus dem Plasma mit dem in den Chloroplasten gebildeten ATP der Lichtphosphorylierung zusammentrifft.

Das gegensätzliche Verhalten von markierter PGS und Gesamtkonzentration der PGS, läßt sich besser durch die Annahme erklären, daß die Radioaktivität, nach kurzfristiger Photosynthese in $C^{14}O_2$, nur zu einem sehr geringen Teil als PGS, im wesentlichen aber als β -Ketosäure vorliegt, die auch unter KCN-Vergiftung im Licht weiter zu Zucker reduziert und isomerisiert werden kann, ohne daß dabei zunächst freies Triosephosphat auftritt. Damit würde die Aldolasehemmung durch KCN für die Photosynthese bedeutungslos.

Es wurde bereits erwähnt, daß die Gesamtkonzentration der β -Ketosäure wahrscheinlich sehr gering ist und daher ihre Reduktion (=Abnahme) keinen nennenswerten Einfluß auf die Gesamtkonzentration der PGS ausübt. Die beobachtete langsame Abnahme der PGS-Gesamtkonzentration ist dann wie im Dunkeln auf die Hemmung der Glykolyse zurückzuführen. Das Abwandern der Radioaktivität aus PGS zu Alanin und organischen Säuren im Dunkeln erklärt sich dann damit, daß nach Ausschalten des Lichtes die Voraussetzungen für die Reduktion der β -Ketosäure entfallen und diese daher zu PGS hydrolysiert wird. Diese markierte PGS wird dann weiter umgesetzt und die Radioaktivität reichert sich im Alanin an.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die Effekte von KCN auf die Veränderung der Zwischenstoffkonzentrationen nur verstanden werden können, wenn man einen kleinen, streng auf den Chloroplasten begrenzten Photosynthese-pool der PGS postuliert, oder davon ausgeht, daß das wirkliche Zwischenprodukt der photosynthetischen CO_2 -Fixierung nicht PGS sondern das Carboxylierungsprodukt des RuDP, also die β -Ketosäure, darstellt.

D. Schlußbetrachtung.

Da die Ergebnisse der Versuche bereits jeweils im Anschluß an die verschiedenen Kapitel diskutiert wurden, wird in diesem Abschnitt lediglich noch einmal, unter Berücksichtigung der Resultate, zu der Frage Stellung genommen, ob die Photosynthese in Umkehr der Glykolyse oder unter Umgehung der Phosphoglyzerinsäure verläuft.

Aus den Versuchen unter verschiedenen Photosynthesebedingungen (Teil II und III, s. S. 42) ergab sich, daß zwischen Photosynthese und PGS-Bildung kein direkter Zusammenhang besteht. Die Veränderungen der PGS-Konzentration konnten auf die Hemmung der Atmung, bzw. der Glykolyse, durch die Photosynthese zurückgeführt werden. Die Verknüpfung beider Vorgänge erfolgt offenbar durch den Phosphatkreislauf.

Auch die Versuche mit MJE, Arsenat, DNP und KCN zeigten, daß der Weg des Kohlenstoffes bei Chlorella, im Gegensatz zu gebrochenen Chloroplasten vermutlich nicht in Umkehr der Glykolyse verläuft. In Abbildung 39 wurden zum Vergleich die Angriffspunkte der verschiedenen Hemmstoffe bei Chlorella und bei gebrochenen Chloroplasten (nach Trebst und Mitarb.- 72) in das kombinierte Photosyntheseschema (s. Abbildung 1) eingetragen.

Die Phosphorylierungsgifte DNP und Arsenat hemmen bei Chlorella die Bildung von RuDP, während sie bei den gebrochenen Chloroplasten primär die Reduktion der PGS verhindern. Bei MJE liegen die Verhältnisse genau umgekehrt. Bei gebrochenen Chloroplasten ist die Bildung von RuDP mit Hilfe der Ribulose-5-phosphatkinase der gegen MJE empfindlichste Schritt, während in ganzen Zellen PGS angeriechert wird, also primär die Reduktion der PGS mit Hilfe der Triosephosphatdehydrogenase gehemmt wird. Da die Photosynthese von Chlorella aber schon durch Konzentrationen von 10^{-6} bis 10^{-5} m MJE zu 70 bis 98 % gehemmt wird (43), während die Triosephosphatdehydrogenase erst durch 10^{-3} m MJE merkbar beeinflusst wird, ergibt sich folgende Reihenfolge der Empfindlichkeit gegenüber MJE:

Photosynthetische CO_2 -Reduktion > Ribulose-5-phosphatkinase > Triosephosphatdehydrogenase.

Da die PGS trotz Blockierung der Ribulose-5-phosphatkinase in Gegenwart von 10^{-3} M MJE im Licht angereichert wird, besteht in ganzen Zellen offenbar die Möglichkeit einer direkten Phosphorylierung des Ribulose-5-phosphat zu Ribulose-1,5-diphosphat unter Umgehung des Adenylsäuresystems.

Zugabe hoher Cyanidkonzentrationen (m/50, m/20, m/10) führt im Dunkeln, abgesehen von der Blockierung der Atmung, zur Hemmung der Aldolase und zu Cyanhydrinbildungen und im Licht außerdem zur Hemmung der Carboxylierungsreaktion (nach Trebat und Mitarb. - (72) verursacht 10^{-3} M KCN bereits eine 98 %ige Hemmung der CO_2 -Fixierung). Die photosynthetische Reduktion sowie die Lichtphosphorylierung scheinen dagegen weitgehend cyanid-unempfindlich zu sein, da einerseits radioaktiv markierte PGS zu Zuckern reduziert wird und andererseits Ribulosediphosphat in großen Mengen angereichert wird.

Wurde nach Zugabe von Cyanid die Verteilung der Radioaktivität nach kurzfristiger C^{14}O_2 -Fixierung mit den Veränderungen der Gesamtkonzentration der Zwischenstoffe verglichen, so zeigte sich ein unterschiedliches Verhalten der markierten PGS verglichen mit der Gesamtkonzentration der PGS. Daraus wurde gefolgert, daß der "Photosynthese-pool" der PGS unverhältnismäßig klein ist, im Vergleich zu der Gesamtkonzentration der PGS in der Zelle. Es ist daher wahrscheinlich, daß es sich bei der markierten PGS lediglich um das Zerfallsprodukt der β -Ketosäure handelt.

Man kann diese Befunde am besten durch die Annahme erklären, daß die Photosynthese (mit einer CO_2 -Fixierungsrate von $200 \mu\text{M}/\text{mg Chlorophyll/h}$) in ganzen Zellen über einen, gegen MJE sehr empfindlichen "PGA-by-pass" führt und energiereiches Phosphat nur für die Bildung von RuDP nötig ist. In gebrochenen Chloroplasten ist diese direkte Reduktion der β -Ketosäure und die direkte Phosphorylierung von Ru-5-ph offenbar nicht möglich. Die β -Ketosäure zerfällt in 2 Moleküle PGS, die in Umkehr der Glykolyse (mit einer CO_2 -Fixierungsrate von $1 - 5 \mu\text{M CO}_2/\text{mg Chlorophyll/h}$) reduziert werden.

Da die Photosynthesereaktionen bei Versuchen mit *Chlorella* immer durch die Effekte der Glykolyse und der Atmung überlagert werden (insbesondere bei der Bestimmung der Zwischenstoff-

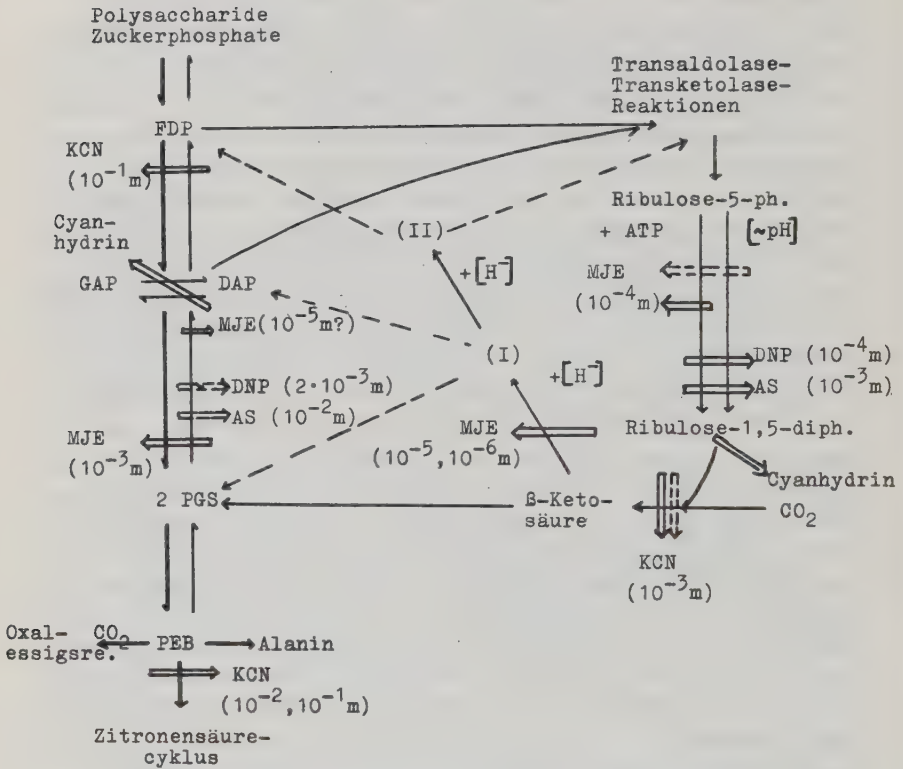


Abbildung 39: Die Angriffspunkte verschiedener Gifte bei der Atmung und Photosynthese von *Chlorella* und bei der Photosynthese gebrochener Chloroplasten.

[$\sim pH$] = das primäre, durch die Lichtphosphorylierung gebildete energiereiche Phosphat;
(I) und (II) = hypothetische Zwischenglieder des "PGA-by-pass" nach Kandler (44);

$\longrightarrow$ = Atmung; $\longrightarrow$ = Photosynthese;
 $\longrightarrow$ = Hemmwirkung bei *Chlorella*;

$\rightleftharpoons$ = Hemmwirkung bei gebrochenen Chloroplasten;

MJE = Monojodessigsäure; **AS** = Arsenat;

DNP = 2,4- Dinitrophenol.

konzentrationen), den gebrochenen Chloroplasten aber offenbar die beiden typischen Photosynthesereaktionen fehlen, sollten Versuche mit ganzen Chloroplasten, die ja die Photosynthese-einheit der grünen Zelle darstellen, noch eindeutigere Ergebnisse liefern.

E. Zusammenfassung.

1. Die Veränderungen der Zwischenstoffkonzentrationen in den ersten Sekunden nach Glucosefütterung im Dunkeln zeigen, daß bei Chlorella die Dephosphorylierung der Phosphoenolbrenztraubensäure für die Glykolyse geschwindigkeitsbestimmend ist.
2. Beim Einschalten von Licht (in Luft + CO₂) nimmt die Konzentration der Phosphoglyzerinsäure (PGS) und der Phosphoenolbrenztraubensäure (PEB) in den ersten Sekunden kräftig ab, während die Triosen (DAP) und Fructosediphosphat (FDP) zunehmen. Einsetzen der Lichtphosphorylierung bewirkt ein deutliches Ansteigen des Adenosintriphosphat-Spiegels (ATP) und Abnahme der Adenosindiphosphatkonzentration (ADP).
3. Beim Licht/Dunkel-Übergang in Luft + CO₂ ergibt sich eine PGS-Anreicherung sowie eine Abnahme der Zuckerphosphate und des ATP.
4. Ein Vergleich von C¹⁴O₂- Fixierungsrate und PGS- Bildungsgeschwindigkeit bei verschiedener Fixierungsrate zeigt, daß beide Vorgänge voneinander unabhängig sind.

Da die Konzentrationsverschiebungen bei Abwesenheit von CO₂ in gleicher Weise wie in Gegenwart von CO₂ erfolgen, ist die Ursache der PGS-Anreicherung, nach Ausschalten des Lichtes, vermutlich bei der vorübergehend mit maximaler Geschwindigkeit einsetzenden Glykolyse und nicht bei der Carboxylierung des Ribulose-1,5-diphosphates (RuDP) zu suchen.

Versuche unter anaeroben Bedingungen bestätigen diese Vermutung.

5. Zugabe von Monojodessigsäure ($3 \cdot 10^{-4}$ m MJE) im Dunkeln bewirkt durch Hemmung der Triosephosphatdehydrogenase eine

starke Anreicherung von FDP und Triosen und eine Abnahme von PGS und deren Folgeprodukten. Bei Belichtung werden das angereicherte FDP und die Triosen über RuDP zu PGS umgesetzt. Da die Reduktion im Licht durch MJE gehemmt wird, reichert sich PGS an.

Die Phosphorylierung des RuDP erfolgt vermutlich direkt durch das energiereiche Phosphat [$\sim$ pH] der Lichtphosphorylierung, unter Umgehung des Adenylsäure-Systems.

6. Arsenat ($3 \cdot 10^{-3}$ m) und 2,4-Dinitrophenol (10^{-4} m) führen nicht zu einer PGS-Zunahme durch ATP-Mangel an der Stufe der Triosephosphatdehydrogenase. Der Angriffspunkt beider Gifte ist anscheinend die Lichtphosphorylierung, wodurch die Bildung von RuDP zum begrenzenden Faktor wird.
7. Zugabe von Cyanid (m/50, m/20, m/10) im Dunkeln, bewirkt Abnahme an ATP, Zunahme an ADP und Zunahme von Brenztraubensäure (BTS) durch Hemmung des Zitronensäure-Cyclus; Abnahme von PEB wegen guter ADP-Versorgung, Anhäufen der Triosen durch Abfangen als Cyanhydrine, Zunahme von FDP durch Aldolase-Hemmung und demzufolge langsame Abnahme von PGS.

Im Licht erfolgen, nach Cyanidvergiftung, die gleichen Konzentrationsveränderungen wie im Dunkeln, abgesehen von einer kurzfristigen PGS-Abnahme in den ersten Sekunden und einer RuDP-Anreicherung durch Unterbrechung der Carboxylierungsreaktion und Abfangen des RuDP als Cyanhydrin.

Vergleicht man die Aktivitätsverteilung cyanidvergifteter Algen nach kurzfristiger Photosynthese in $C^{14}O_2$ mit der Veränderung der Gesamtkonzentration der Zwischenstoffe, so ist das gegensätzliche Verhalten der PGS auffällig. Man muß annehmen, daß der "Photosynthese-pool" der PGS nur durch Zerfall der β -Ketosäure entsteht.

8. Vergleicht man die von anderen Autoren (72) beschriebene Wirkung der Gifte auf gebrochene Chloroplasten mit den eigenen Befunden an ganzen Zellen, so liegt der Schluß nahe, daß der direkte Reduktionsweg unter Umgehung der PGS, sowie die direkte Phosphorylierung des RuDP durch [$\sim$ pH] in dem rekonstruierten System fehlen. Eventuell handelt es sich um ein Fermentsystem, das bei der Isolierung der Chloroplasten zerstört wird, sodaß die geringe Fixierung der Chloroplasten in Umkehr der Glykolyse erfolgen muß.

F. Literaturverzeichnis.

1. Arnon, D.J. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphe-
noloxidase in *beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24,
1 - 15 (1949).
2. Arnon, D.J., M.B. Allen and F.R. Whatley. Photosynthesis by
isolated chloroplasts. IV. General concept and com-
parison of three photochemical reactions. *Biochim.*
Biophys. Acta 20, 446 (1956).
3. Avron, M. and A.T. Jagendorf. *J. Biol. Chem.* 234, 967 (1959).
4. Bassham, J.A., A.A. Benson, L.D. Kay, A.Z. Harris, A.T. Wilson
and M. Calvin. The path of carbon in photosynthesis.
XXI. The cyclic regeneration of carbondioxide ac-
ceptor. *J. Am. Chem. Soc.* 76, 1760 (1954).
5. Bassham, J.A., K. Shibata, K. Steenberg, J. Bourdon, and M. Calvin.
The photosynthetic cycle and respiration: Light-
dark transients. *J. Am. Chem. Soc.* 78, 4120 (1956).
6. Bassham, J.A. and M. Calvin. The path of carbon in photosynthe-
sis. Prentice - Hall, Inc. Englewood Cliffs, N.J.
1957.
7. Bassham, J.A. and M. Kirk. Dynamics of the photosynthesis of
carbon compounds. I. Carboxylation reactions.
Biochim. Biophys. Acta 43, 447 - 464 (1960).
8. Beisenherz, G., H.J. Boltze, Th. Bücher, R. Czok, K.H. Garbade,
E. Meyer - Arendt und G. Pfeleiderer. Diphosphofruc-
tose- Aldolase, Phosphoglyzeraldehyd - Dehydro -
genase, Glyzerophosphat - Dehydrogenase und Py-
ruvat - Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem
Arbeitsgang. *Z. Naturforschg.* 8b, 555 - 577
(1953).
9. Bradley, D.F. Phosphate transients in photosynthesis. Uni-
versity of California Radiation Laboratory,
Berkeley, California. UCRL - 3242 (1955).
10. Bradley, D.F. Phosphate transients in photosynthesis. *Arch.*
Biochem. Biophys. 68, 172 - 185 (1957).

11. Calvin, M., J.A. Bassham, A.A. Benson, V.H. Lynch, C. Quillet, L. Schou, W. Stepka and N.E. Tolbert. Carbon dioxide assimilation in plants. Symposia of the Society for Experimental Biology V, Carbon dioxide fixation and photosynthesis. (1951).
12. Calvin, M. and P. Massini. The path of carbon in photosynthesis. XX. The steady state. *Experientia* Vol. VIII/12, 445 (1952).
13. Calvin, M. and N.G. Pon. Carboxylations and decarboxylations. *J. Cell. and Comp. Phys.* 54, 51 - 75 (1959).
- 13b. Calo, N. and M. Gibbs. The site of inhibition of iodoacetamide in photosynthesis studied with chloroplasts and cell free preparations of spinach. *Z. Naturforsch.* 15b, 287 (1960).
14. Chance, B. and R. Sager. Oxygen and light induced oxydations of cytochrome, flavoprotein and pyridinenucleotide in a *Chlamydomonas* mutant. *Plant Physiol.* 32, 548 - 561 (1958).
15. Colowick, S.P. and N.O. Kaplan. *Methods in Enzymology* 1 - V. Academic Press Inc., Publishers New York 1957.
16. Duysens, L.M.N. Reversible changes in the absorption spectrum of *Chlorella* upon irradiation. *Science* 120, 353 - 354 (1954).
17. Elbertzhagen, H. Technical Status Report No 4. Office of Aerospace Research, Contract No. AF 61 (052) - 244. (1960).
18. Emerson, R. and C.M. Lewis. *Am. J. Biol.* 30, 165 (1943).
19. Fewson, C.A., P.K. Kindel and M. Gibbs. The role of fructose-1,6 - diphosphate - aldolase in photosynthesis. *Plant Physiol.* 36, Suppl. IX (1961).
20. Freytag, R. Zusammenwirken der Gärungsfermente in lebenden Hefezellen. Dissertation Universität München 1958.
21. Gaffron, H. The effect of the specific poisons upon photoreduction with hydrogen in green algae. *J. gen. Physiol.* 26, 195 - 217 (1942).

22. Gest, H. and M.D. Kamen. Studies on the phosphorus metabolism of green algae and purple bacteria in relation to photosynthesis. *J. Biol. Chem.* 176, 299 - 318 (1948).
23. Gibbs, M. and O. Kandler. Asymmetric distribution of C^{14} in sugar formed during photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 43, 446 - 451 (1957).
24. Goodman, M., D.F. Bradley and M. Calvin. Phosphorus and Photosynthesis. I. Differences in the light and dark incorporation of radiophosphate, *J. Am. Chem. Soc.* 75, 1962 (1953).
25. Holzer, H. und F. Lynen. Über den aeroben Phosphatbedarf der Hefe. III. Labil an die Struktur gebundenes Phosphat in lebender Hefe. *Ann. Chem.* 569, 138 (1950).
26. Holzer, H. Photosynthese und Atmungskettenphosphorylierung. *Z. Naturforschg.* 6b, 424 (1951).
27. Holzer, H. Chemie und Energetik der pflanzlichen Photosynthese. *Z. angew. Chemie* 66, 65 (1954).
28. Holzer, H. und R. Freytag - Hilf. Zusammenwirken der Gärungsenzyme beim anaeroben und aeroben Glucoseumsatz in Hefezellen. *Hoppe Seyler Z. phys. Chemie* 316, 7 (1959).
29. Kahn, J.S. und Jagendorf. *Biochem. Biophys. Res. Communications* 2, 259 (1960).
30. Kandler, O. Über die Beziehungen zwischen Phosphathaushalt und Photosynthese I. Phosphatspiegelschwankungen bei *Chlorella pyrenoidosa* als Folge des Licht-Dunkel - Wechsels. *Z. Naturforschg.* 5b, 423 (1950).
31. Kandler, O. Über die Beziehungen zwischen Phosphathaushalt und Photosynthese II. Gesteigerter Glucoseeinbau im Licht als Indikator einer lichtabhängigen Phosphorylierung. *Z. Naturforschg.* 9b, 626 - 644 (1954).
32. Kandler, O. Eine Methode zur quantitativen Bestimmung der Lichtphosphorylierungsgeschwindigkeit. *Z. Naturwiss.* 42, 390 (1955).

33. Kandler, O. Beziehungen zwischen Phosphathaushalt und Photosynthese III. Hemmungsanalyse der lichtabhängigen Phosphorylierung. Z. Naturforschg. 10b, 38 (1955).
34. Kandler, O. A cyanide insensitive photophosphorylation in chlorella. Plant Physiol. 31, XVII - XVIII (1956).
35. Kandler, O. and M. Gibbs. Asymetric distribution of C^{14} in glucosephosphates formed during photosynthesis. Plant Physiol. 31, 411 (1956).
36. Kandler, O. und F. Schötz. Untersuchungen über die photooxydative Farbstoffzerstörung und Stoffwechselhemmung bei Chlorellamutanten und panaschierten Oenotheren. Z. Naturforschg. 11b, 710 (1956).
37. Kandler, O. Beziehungen zwischen Phosphathaushalt und Photosynthese IV. Zur Frage einer stöchiometrischen Beziehung zwischen CO_2 -Reduktion und Phosphatumsatz. Z. Naturforschg. 12b, 271 (1957).
38. Kandler, O. Identifizierung von radioaktiver Hamamelonsäure aus Chlorella nach kurzfristiger Photosynthese mit $C^{14}O_2$ und hohen KCN-Konzentrationen. Z. Naturwiss. 44, 562 (1957).
39. Kandler, O. The effect of 2,4-Dinitrophenol on respiration, oxydative assimilation, and photosynthesis in chlorella. Physiol. Plantarum 11, 675 - 684 (1958).
40. Kandler, O. Einfluß von Alkoholvergiftung auf die Verteilung von C^{14} nach kurzfristiger Photosynthese in $C^{14}O_2$. Z. Naturforschg. 13b, 219 (1958).
41. Kandler, O. Occurence of an unknown radioactive substance after short - time photosynthesis in $C^{14}O_2$. Arch. Biochem. Biophys. 73, 38 - 42 (1958).
42. Kandler, O. und M. Gibbs. Untersuchungen über den Einfluß der Photosynthese auf die Austauschvorgänge innerhalb des Hexosemoleküls. Z. Naturforschg. 14b, 8 - 13 (1959).

43. Kandler, O., I. Liesenkötter und B.A. Oaks. Die Wirkung von Monojodessigsäure auf Atmung und Photosynthese von *Chlorella*. Z. Naturforschg. 16b, 50 - 61 (1961).
44. Kandler, O. and I. Liesenkötter. The effect of moniodo acetic acid, arsenate, and dinitrophenol on the path of carbon in photosynthesis. Symposium V. Internat. Biochem. Kongress, Moskau 1961.
45. Kauß, H. Isotopenstudien zum Problem der Kohlensäureassimilation durch grüne Pflanzen. Dissertation Universität München 1961.
46. Kornberg, H.L., I.R. Quayle and M. Calvin. University of California, Radiation Laboratory Report. UCRL 2885 (1955).
47. Leuthardt, F. Lehrbuch der physiologischen Chemie. Walter de Gruyter und Co / Berlin 1959.
48. Lynen, F. und R. Königsberger. Nachweis der Phosphorylierung bei der alkoholischen Gärung durch lebende Hefe. Ann. Chem. 569, 129 (1950).
49. Lynen, F. und R. Königsberger. Zum Mechanismus der Pasteur'schen Reaktion: Der Phosphat - Kreislauf in der Hefe und seine Beeinflussung durch 2,4 - Dinitrophenol. Ann. Chem. 573, 60 - 84 (1951).
50. Lynen, F. Phosphatkreislauf und Pasteureffekt. Proceedings of the International Symposium on Enzyme Chemistry, Tokyo and Kyoto 1957.
51. Losada, M., A. Trebst and D.L. Arnon. Photosynthesis by isolated chloroplasts. XI. CO₂ assimilation in a reconstituted chloroplast system. J. Biol. Chem. 235, 833 (1960).
52. Miyachi, S. Effect of some sulfhydrylreagents on lightinduced CO₂ - fixation in *Chlorella*. Plant and Cell Physiol. 1, 117 - 130 (1960).
53. Mortimer, D.C. Evidence for an alternate pathway in photosynthetic assimilation. Naturwiss. 45, 116 (1958).

54. Moses, V. and M. Calvin. The path of carbon in photosynthesis. XXII. The identification of carboxy - keto - pentitol - diphosphates as products of photosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. 43, 260 - 277 (1957).
55. Oh - Hama, T., S. Miyachi and H. Tamiya. Change of oxido - reductive levels of pyridine nucleotides in the mechanism of photosynthesis. IX. International Botanical Congress, Proceedings, Vols. II, II A (1959).
56. Peterskofsky, A. and E. Racker. The reductive pentosephosphate cycle III. Enzyme activities in cell - free extracts of photosynthetic organisms. Plant Physiol. 36, 409 (1961).
57. Porter, H. K., R. V. Martin and I. F. Bird. Synthesis and dissolution of starch labelled with C^{14} in tobacco leaf tissue. Exper. Botany 10, 264 - 276 (1959).
58. Racker, R. Phosphoribulokinase und Ribulosediphosphatcarboxylase. Arch. Biochem. Biophys. 69, 300 (1957).
59. Rabin, B. R., D. F. Shaw, N. G. Pon, J. M. Anderson and M. Calvin. Cyanide effects on carbon dioxide fixation in chlorella. J. Am. Chem. Soc. 80, 2528 (1958).
60. Rauen, H. M. Biochemisches Taschenbuch, Springer - Verlag 1956.
61. Richter, G. Comparison of enzymes of sugar metabolism in two photosynthetic algae: *anacystis nidulans* and *chlorella pyrenoidosa*. Naturwiss. 46, 604 (1959).
62. Ruhland, W. Handbuch der Pflanzenphysiologie V/1 917, 967, 987. Springer Verlag 1960.
63. Ruhland, W. Handbuch der Pflanzenphysiologie XII/1/2. Springer Verlag 1960.
64. Schmidt, O. Th. und C. C. Weber - Molster. Über Zucker mit verzweigter Kohlenstoffkette III. Die Konfiguration der beiden Fructoheptonsäuren und der Hamamelose. Ann. Chem. 515, 43 - 64 (1934).

65. Schmidt, O.Th. und K.Heintz. Über Zucker mit verzweigter Kohlenstoffkette V. Die Synthese der Hamamelonsäure. Ann. Chem. 515, 77 - 96 (1934).
66. Schwinck, L. Nachweis von Adenosintriphosphorsäure (ATP) in Grünalgen und Helodea, sowie Einbau von radioaktivem Phosphor (P^{32}). Planta 47, 165 - 218 (1956).
67. Simonis, W. und E.Quenzel. Zur Wirkung von MJE auf die lichtabhängige Phosphorylierung (P^{32}) bei Helodea crispa. Naturwiss. 43, 204 (1956).
68. Simonis, W. and M.Ehrenberg. Investigations on light - dependent phosphorylation in plants by means of phosphorus - 32. UNESCO/NS/RIC/182.
69. Simonis, W. und G.Weichart. Die Wirkung von Monojodessigsäure auf die Bildung von P^{32} markierten phosphorylierten Verbindungen in Helodea densa. (Phosphoglycerinsäure - ein Zwischenprodukt der Photosynthese ?). Z. Naturforschg. 13b, 694 (1958).
70. Simonis, W. und G.Weichart. Quantitative Unterschiede der Bildung von P^{32} markierten phosphorylierten Verbindungen in Helodea. Z. Naturforschg. 13b, 55 - 56 (1958).
71. Simonis, W. und W.Urbach. Untersuchungen zur lichtabhängigen Phosphorylierung. VIII. Über den Einfluß von 2,4 - Dinitrophenol bei Ankistrodesmus braunii. Z. Naturforschg. 15b, 816 (1960).
72. Trebst, A., M.Losada and D.J.Arnon. Photosynthesis by isolated chloroplasts. XII. Inhibitors of CO_2 - assimilation in a reconstituted chloroplast system. J. Biol. Chem. 235, 840 (1960).
73. Trebst, A. und F.Fiedler. C^{14} - Verteilung in der Glucose bei der Photosynthese mit Chloroplasten. Z. Naturforschg. 16b, 284 - 285 (1961).
74. Umbreit, W.W., R.H.Burris and J.F.Stauffer. Manometric Techniques. Burgess Publishing Co. 1959.

75. Veen van der, R. Induction phenomena in photosynthesis. *Physiol. Plantarum* 2, 217 (1949).
76. Warburg, O. Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten. Verlag Dr. Saenger, Berlin 1948.
77. Warburg, O. Wasserstoffübertragenden Fermente. Verlag Dr. W. Saenger, Berlin 1948.
78. Wassink, E.C. and J. Rombach. Preliminary report on experiments dealing with phosphate metabolism in the induction phase of photosynthesis in chlorella. Koninkl. Nederl. Akad. van Wetenschappen Amsterdam. Proceedings Series C 57, 493 (1954).
79. Weichart, G. Untersuchungen über Phosphorylierungsprozesse bei der Photosynthese höherer Pflanzen (Helodea) unter Verwendung von radioaktivem Phosphat. *Planta* 56, 262 - 289 (1961).
80. Weißbach, A., B.L. Horecker and J. Hurwitz. The enzymatic formation of phosphoglyceric acid from ribulose - diphosphate and carbon - dioxide. *J. Biol. Chem.* 218, 798 (1956).
81. Wilson, A.T. and M. Calvin. The photosynthetic cycle. CO₂ - dependent transients. *J. Am. Chem. Soc.* 77, 5948 - 5957 (1955).
82. Wintermans, J.F.G.M. Polyphosphate formation in chlorella in relation to photosynthesis. Mededelingen van de Landbouwhogeschool te Wageningen/Nederland 55, 69 - 126 (1955).

Lebenslauf

Am 9.7.1934 wurde ich, Inge Klara Gertrud Liesenkötter, in Berlin - Charlottenburg als Tochter des Bildhauers Bernhard Liesenkötter und seiner Ehefrau Ilse, geb. Griebel, geboren. Von 1940 - 1943 besuchte ich die Volksschule in Berlin - Pankow und nach Evakuierung aus Berlin für einige Monate die Volksschule in Kulmbach/ Main, während ich die 4. Klasse der Volksschule in Posen abschloß. Von dort flüchteten wir 1944 wieder nach Kulmbach, wo ich von 1944 bis 1952 das Mädchenrealgymnasium (Oberrealschule im Abbau) besuchte und im Juli 1952 das Abitur ablegte. Nach einjährigem Aufenthalt in England, begann ich im Wintersemester 1953/54 an der Freien Universität in Berlin das Studium der Naturwissenschaften mit dem Hauptfach Chemie. Vom Sommersemester 1956 bis zum Wintersemester 1957/58 studierte ich an der Universität München, machte meine Zulassungsarbeit in organischer Chemie bei Prof. Dr. F. Wille und legte im Herbst 1958 das Staatsexamen ab. Nach einem biochemischen Praktikum bei Prof. Dr. F. Lynen im Biochemischen Institut der Universität München, begann ich im Mai 1959 am Bakteriologischen Institut der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft Weihenstephan / Freising unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. O. Kandler mit der Ausarbeitung der vorliegenden Dissertation. Seit zwei Jahren bin ich als wissenschaftliche Hilfskraft angestellt.

Die vorliegende Arbeit wurde von mir im Bakteriologischen Institut der Süddeutschen Versuchs - und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft Weißenstephan in den Jahren 1959 - 1961 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. O. Kandler vom Institut für angewandte Botanik der Technischen Hochschule München angefertigt. Für alle Anregung, Unterstützung und das große Interesse an der Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. O. Kandler herzlich danken. Dank schulde ich außerdem der U. S. Air Force (Office of Aerospace Research, Contract No AF 61 (052) - 244) für die finanzielle Unterstützung.

